



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS**  
**FARMACÊUTICAS**

**PARTICIPAÇÃO DE RECEPTORES NORADRENÉRGICOS**  
**NA SUBSTÂNCIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL DORSAL**  
**NA MODULAÇÃO DE COMPORTAMENTOS DEFENSIVOS**  
**RELACIONADOS À ANSIEDADE**

**DAYANE DE OLIVEIRA SOUZA**

**VITÓRIA-ES**  
**NOVEMBRO DE 2016**



Dayane de Oliveira Souza

**PARTICIPAÇÃO DE RECEPTORES NORADRENÉRGICOS  
NA SUBSTÂNCIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL DORSAL  
NA MODULAÇÃO DE COMPORTAMENTOS DEFENSIVOS  
RELACIONADOS À ANSIEDADE**

Dissertação de Mestrado apresentada à  
Universidade Federal do Espírito Santo,  
como requisito parcial para obtenção do  
título de mestre em Ciências Farmacêuticas,  
do Programa de Pós-graduação em Ciências  
Farmacêuticas.

Orientadora: Valquíria Camin de Bortoli

Co-orientador: Juliano Manvailer Martins

VITÓRIA-ES

NOVEMBRO DE 2016

## FICHA CATALOGRÁFICA

Dayane de Oliveira Souza

**PARTICIPAÇÃO DE RECEPTORES NORADRENÉRGICOS NA  
SUBSTÂNCIA CINZENTA PERIAQUEDUTAL DORSAL NA  
MODULAÇÃO DE COMPORTAMENTOS DEFENSIVOS  
RELACIONADOS À ANSIEDADE**

Vitória-ES, 04 de novembro de 2016.

**BANCA EXAMINADORA:**

---

**Profa. Dra. Vanessa Beijamini Harres  
Universidade Federal do Espírito Santo**

---

**Profa. Dra. Ana Paula Santana de Vasconcellos Bittencourt  
Universidade Federal do Espírito Santo**

---

**Profa. Dra. Valquíria Camin de Bortoli  
Universidade Federal do Espírito Santo- Campus São Mateus**

Dedico esta, bem como todas as minhas demais conquistas primeiramente a Deus, por ser essencial em minha vida, autor de meu destino, meu guia, socorro presente na hora da angústia. Ao meu pai Domingos, minha mãe Silvana e ao meu irmão Mateus.

## **AGRADECIMENTOS**

Se você está lendo esta página é porque eu consegui. E não foi fácil chegar até aqui. Do processo seletivo, passando pela aprovação até a conclusão do Mestrado, foi um longo caminho percorrido. Nada foi fácil, nem tampouco tranquilo.

Quero agradecer a Deus primeiramente por ter me dado saúde e força para superar as dificuldades. O Senhor que foi o meu refúgio, meu consolo e minha certeza de que tudo daria certo.

À minha preciosa orientadora Profa. Dra. Valquíria Camin de Bortoli, pela escolha para ser sua orientada, sei que não é fácil aceitar alguém para lapidar e compartilhar conhecimentos, isso exige muita confiança. Te agradeço por sempre compreender as minhas dificuldades, me ensinar, me dar bronca, do mesmo jeito que uma mãe faz. Eu posso dizer que a minha formação, inclusive pessoal, não teria sido a mesma sem você. Obrigada pela paciência na orientação e incentivo que tornaram possível a conclusão desta dissertação. Obrigada por sempre enxergar uma solução aonde eu não era capaz de ver. Por muitas vezes foi o seu otimismo que me fez acreditar que tudo isso seria possível. Espero ser motivo de orgulho sempre, assim como tenho de dizer que fui sua aluna.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Juliano Manvailer Martins, que ao lado da Valquíria sempre buscou tornar nosso sonho realidade. Agradeço as sugestões e a contribuição para que eu me tornasse uma profissional melhor.

À todos os professores do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas e do Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Farmacologia, que foram tão importantes na minha vida acadêmica e no desenvolvimento desta dissertação, sejam pelas disciplinas ministradas ou pelas sugestões para enriquecimento do meu trabalho.

À banca examinadora, pelas preciosas sugestões, que tornaram este trabalho melhor.

Não poderia deixar de citar o Rodolfo, que sempre se esforçou para fornecer animais para meus experimentos, assim como o LHMI, que sempre me priorizou no agendamento do criostato e a FAPES, pelo apoio financeiro.

A todos meus colegas de laboratório, muito obrigada pela ajuda. Johnathan, obrigada por me ensinar todas as técnicas, pelos artigos, dicas e principalmente pela companhia. Foram muitas descobertas, encrencas, dificuldades e momentos de descontração que enfrentamos juntos. Provamos que é possível construir amizades mesmo na correria entre experimentos.

Aos meus pais, por sua capacidade de acreditar e investir em mim. Mãe, seu cuidado e dedicação foi que deram, em alguns momentos, a esperança para seguir. Pai, sua presença significou segurança e certeza de que não estou sozinha nessa caminhada. Só tenho a agradecer esse amor incondicional que vocês me oferecem em todo o tempo, que me fazem sempre ter certeza que eu sempre posso voltar para casa. A vocês que, muitas vezes, renunciaram aos seus sonhos para que eu pudesse realizar o meu, partilho a alegria deste momento.

Ao meu irmão Mateus, que apesar de mais novo, sempre está disposto a me ouvir e me aconselhar.

À todos meus familiares, que constantemente tem compreendido a minha ausência. Valeu a pena toda distância, todo sofrimento, todas as renúncias. Essa vitória não é somente minha.

Aos amigos e colegas, pelo incentivo e apoio constantes, pelas alegrias, tristezas e dores compartilhadas. Com vocês, as pausas entre um parágrafo e outro de produção melhoraram tudo o que tenho produzido, vocês fazem a minha vida valer cada vez mais a pena.

Por falar em amigos, quero agradecer as minhas grandes amigas de república, que estão comigo desde a graduação e espero tê-las pelo resto da minha vida. Obrigada pelos momentos de distração, pelas brigas, pelo amor de irmã. Vocês são minha segunda família.

Por fim, todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigado.

*“Um pedaço de pão comido em paz é melhor do que um banquete comido com ansiedade (ESOPÓ)”.*



## RESUMO

O papel da substância cinzenta periaquedutal dorsal (SCPD) no medo e na ansiedade tem sido estudado ao longo das últimas décadas. As evidências sobre o envolvimento do sistema noradrenérgico na ansiedade são conflitantes, dependendo da estrutura cerebral estudada. Assim, no presente estudo, testou-se a hipótese de que a noradrenalina administrada diretamente na SCPD de ratos apresenta efeito do tipo ansiolítico no teste de transição claro-escuro. O teste de transição claro-escuro é um modelo etológico de ansiedade, de rápida e fácil execução, que não requer treinamento animal. Para isso, ratos Wistar receberam a administração intra-SCPD de noradrenalina (30, 60 ou 90 nmols) ou salina e foram expostos no teste de transição claro-escuro. Além disso, foi investigado o efeito do pré-tratamento intra-SCPD com antagonistas não seletivos de receptores adrenérgicos alfa e beta, fentolamina (10 nmols) e propranolol (10 nmols) respectivamente, sobre o efeito da injeção de noradrenalina na mesma estrutura. Após os testes, os animais eram colocados durante cinco minutos no campo aberto, para medida da atividade locomotora. Nossos resultados mostram que a noradrenalina (30 e 60 nmols) administrada diretamente na SCPD aumentou o tempo de permanência no compartimento claro e o número de transições dos animais submetidos ao teste de transição claro-escuro, sugerindo um efeito do tipo ansiolítico. Além disso, injeção intra-SCPD de noradrenalina não alterou a atividade locomotora dos animais no teste do campo aberto. Os resultados mostram ainda que o pré-tratamento intra-SCPD de propranolol ou fentolamina atenuou o efeito do tipo ansiolítico da noradrenalina quando analisado o tempo de permanência no compartimento claro do modelo. Assim, o presente trabalho sugere um envolvimento da neurotransmissão noradrenérgica na SCPD, via receptores alfa e beta-adrenérgicos, em reações defensivas associadas com o transtorno de ansiedade generalizada em animais submetidos ao modelo de transição claro-escuro.

Palavras-chave: Noradrenalina, substância cinzenta periaquedutal dorsal, ansiedade, teste de transição claro-escuro.

## **ABSTRACT**

The role of the dorsal periaqueductal gray matter (DPAG) in fear and anxiety has been studied over the last decades. The evidence regarding the involvement of the noradrenergic system in anxiety is conflicting, depending on brain structure studied. Thus, in the present study we tested the hypothesis that noradrenaline injected directly into the DPAG of rats has anxiolytic-like effect in the light-dark transition test. The light-dark transition test is an ethological model of anxiety, quick and easy to perform, that does not require animal training. For this, Wistar rats were given intra-DPAG administration of noradrenaline (30, 60 or 90 nmol) or saline and tested in light-dark test. In addition, we investigated the effect of pre-treatment with intra-DPAG nonselective antagonists of alpha and beta-adrenergic receptors, phentolamine and propranolol, respectively, in the effect of noradrenaline injection in the same structure. After the tests, the animals were placed for five minutes in the open field, for measurement of locomotor activity. Our results show that noradrenaline (30 and 60 nmols) administered directly into the SCPD increased time spent in the light compartment and the number of transitions of the animals submitted to the light-dark transition test, suggesting an anxiolytic-like effect. In addition, intra-SCPD injection of norepinephrine did not change locomotor activity of animals in the open field test. The results also show that pre-treatment with intra-SCPD propranolol or phentolamine attenuated anxiolytic-like effect of norepinephrine when analyzing the time spent in the light compartment of the model. Thus, this work suggests an involvement of noradrenergic neurotransmission in the SCPD, via alpha and beta-adrenergics receptors in defensive reactions associated with generalized anxiety disorder in animals in the light-dark transition model.

**Keywords:** Noradrenaline, dorsal periaqueductal gray matter, anxiety, light-dark test.

## Lista de Figuras

<b>Figura 1-</b> Regulação pré-sináptica da neurotransmissão da noradrenalina.....	22
<b>Figura 2-</b> Caixa claro-escuro.....	30
<b>Figura 3-</b> Campo aberto.....	31
<b>Figura 4-</b> Representação esquemática de cortes coronais de encéfalos de ratos .....	37
<b>Figura 5-</b> Sítios de injeções na SCPD.....	37
<b>Figura 6-</b> Latência para a primeira entrada no compartimento escuro (Curva dose-resposta da noradrenalina) .....	38
<b>Figura 7-</b> Tempo de permanência no compartimento claro (Curva dose-resposta da noradrenalina) .....	39
<b>Figura 8-</b> Número de transições entre os compartimentos claro e escuro (Curva dose-resposta da noradrenalina) .....	39
<b>Figura 9-</b> Latência para a primeira entrada no compartimento escuro (Pré-tratamento com antagonista não seletivo de receptores $\beta$ , Propranolol) .....	41
<b>Figura 10-</b> Tempo de permanência no compartimento claro (Pré-tratamento com antagonista não seletivo de receptores $\beta$ , Propranolol) .....	41
<b>Figura 11-</b> Número de transições entre os compartimentos claro e escuro (Pré-tratamento com antagonista não seletivo de receptores $\beta$ , Propranolol) .....	42
<b>Figura 12-</b> Latência para a primeira entrada no compartimento escuro (Pré-tratamento com antagonista não seletivo de receptores $\alpha$ , Fentolamina) .....	43
<b>Figura 13-</b> Tempo de permanência no compartimento claro (Pré-tratamento com antagonista não seletivo de receptores $\alpha$ , Fentolamina) .....	44
<b>Figura 14-</b> Número de transições entre os compartimentos claro e escuro (Pré-tratamento com antagonista não seletivo de receptores $\alpha$ , Fentolamina) .....	44

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1-</b> Transtornos de Ansiedade .....	16
<b>Tabela 2-</b> Modelos animais de ansiedade.....	25
<b>Tabela 3-</b> Efeito da administração intra-SCPD de salina ou noradrenalina nas doses de 30, 60 ou 90 nmols sobre o número de cruzamentos no campo aberto.....	40
<b>Tabela 4-</b> Efeito da administração prévia intra-SCPD de propranolol ou salina sobre o número de cruzamentos no campo aberto de animais que receberam injeção intra-SCPD de noradrenalina ou salina.....	42
<b>Tabela 5-</b> Efeito da administração prévia intra-SCPD de fentolamina ou salina sobre o número de cruzamentos no campo aberto de animais que receberam injeção intra-SCPD de noradrenalina ou salina.....	45

## **Lista de Abreviaturas**

**5-HT** – Serotonina

**ACTH** – hormônio adrenocorticotrófico

**ANOVA** – Análise de variância

**CCK** – Colecistocinina

**DSM-V** – *Diagnostic Statistical Manual of Mental Disorders*

**GABA** – Ácido gama-aminobutírico

**HPA** – eixo hipotálamo-pituitária-adrenal

**MAO** – Inibidores da enzima monoaminoxidase

**LC** – *Locus coeruleus*

**LCE** – Labirinto em cruz elevado

**LHMI** – Laboratório de histologia molecular e imunohistoquímica

**LTE** – Labirinto em T elevado

**NA** – Noradrenalina

**NLET** – Núcleo leito da estria terminal

**NMDA** – N-metil D-Aspartato

**NTS** – Núcleo do trato solitário

**SCP** – Substância cinzenta periaquedutal

**SCPD** – Substância cinzenta periaquedutal dorsal

**SCPV** – Substância cinzenta periaquedutal ventral

**TAG** – Transtorno de ansiedade generalizada

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
1.1. Ansiedade .....	15
1.2. Reações de defesa e ansiedade .....	17
1.3. Substância cinzenta periaquedutal dorsal e ansiedade .....	19
1.4. Sistema noradrenérgico e ansiedade .....	20
1.5. Modelos animais de ansiedade.....	25
1.6. Teste de transição claro-escuro .....	26
<b>2. OBJETIVO .....</b>	<b>28</b>
2.1. Geral .....	28
2.2. Específicos.....	28
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>29</b>
3.1. Animais .....	29
3.2. Drogas .....	29
3.3. Aparelhos experimentais .....	30
3.3.1. Caixa claro-escuro.....	30
3.3.2. Campo aberto .....	31
3.4. Procedimentos .....	31
3.4.1. Cirurgia .....	31
3.4.2. Injeção intracerebral .....	32
3.4.3. Testes comportamentais.....	33
3.4.3.1. Habituação.....	33
3.4.3.2. Teste de transição claro-escuro.....	33
3.4.3.3. Campo aberto.....	34
3.4.4. Perfusão e histologia .....	34
3.5. Grupos experimentais e procedimentos .....	35
3.5.1. Experimento 1: Curva dose-resposta da noradrenalina.....	35
3.5.2. Experimento 2: Pré-tratamento intra-SCPD com antagonista não seletivo de receptores beta-adrenérgicos.....	35
3.5.3. Experimento 3: Pré-tratamento intra-SCPD com antagonista não seletivo de receptores alfa-adrenérgicos.....	35
3.6. Análise estatística.....	36
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>37</b>
4.1. Experimento 1: Efeito da administração intra-SCPD de noradrenalina ou salina em ratos submetidos ao modelo de transição claro-escuro.....	38

4.2. Experimento 2: Efeito do pré-tratamento intra-SCPD com propranolol (antagonista não seletivo de receptores beta-adrenérgicos) sobre a administração intra-SCPD de noradrenalina em ratos submetidos ao modelo de transição claro-escuro.....	40
4.3. Experimento 3: Efeito do pré-tratamento intra-SCPD com fentolamina (antagonista não seletivo de receptores alfa-adrenérgicos) sobre a administração intra-SCPD de noradrenalina em ratos submetidos ao modelo de transição claro-escuro.....	42
<b>5. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.....</b>	<b>46</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>51</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>52</b>
<b>8. ANEXO.....</b>	<b>64</b>
8.1. Cópia da aprovação do projeto de pesquisa na comissão de ética em uso de animais.....	64

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Ansiedade

A compreensão da ansiedade tem se tornado um grande desafio, haja vista que a ansiedade vem afetando em diferentes níveis, um grande número de indivíduos.

Segundo Lewis (1979), a ansiedade pode ser conceituada como “estado emocional vivenciado com a qualidade subjetiva do medo ou emoção a ele relacionada, desagradável, voltado para o futuro, desproporcional a uma ameaça reconhecível, com desconforto subjetivo e manifestações somáticas”.

Desse modo, a ansiedade faz parte do espectro normal das emoções humanas e até determinado ponto é propulsora do desempenho. Assim, toda tarefa possui um ponto ótimo de ansiedade para que possa ser realizada da melhor forma possível (YERKES; DODSON, 1908), de tal maneira que a ansiedade e o medo são caracterizados como estados emocionais de grande valor adaptativo (BRANDÃO, 2001).

Em conformidade com as ideias evolutivas de Darwin, propõe-se que o valor adaptativo da ansiedade se encontra justamente no fato da mesma possuir uma função biológica a cumprir, como reação a um estado de perigo. Em relação às ideias de Freud, a ansiedade seria adaptativa, não apenas por preparar o animal para lidar com o perigo por meio da mobilização de energia psíquica, mas também por auxiliar na detecção antecipada de novas ocorrências do estado de perigo em questão (VIANA, 2010).

Segundo Davis e colaboradores (1997), o medo é a resposta emocional provocada por um estímulo ameaçador e claramente identificável, que cessa logo após o término do estímulo eliciador. Já a ansiedade não se encontra claramente associada a um único estímulo provocador, ocorrendo em circunstâncias onde o perigo é apenas potencial, possuindo, portanto, um componente de incerteza.

Esses dois estados emocionais se sobrepõem, mas também se diferenciam, com o medo sendo com mais frequência associado a períodos de excitabilidade autonômica aumentada, necessária para luta ou fuga e pensamentos de perigo imediato. Já a ansiedade é mais frequentemente associada à tensão muscular e vigilância em



preparação para perigo futuro e comportamentos de cautela ou esquiva (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2014).

A ansiedade então passa a ser patológica quando seus níveis estão desproporcionais à situação que a desencadeia, ou quando não existe um objeto específico ao qual se direcione. Torna-se contraprodutiva ou incapacitante, prejudicando o indivíduo na execução de atividades cognitivas e/ou motoras, além de acarretar acentuado sofrimento (BRANDÃO, 2001).

Em 2014, a Associação Psiquiátrica Americana publicou a quinta edição do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-V, em inglês *Diagnostic Statistical Manual of Mental Disorders*), que baseado na apresentação clínica dos transtornos, estabelece a classificação mais recente dos diferentes transtornos de ansiedade. Esta classificação está representada na tabela 1.

Tabela 1- Transtornos de ansiedade

---

Transtorno de ansiedade de separação

Fobia específica

Transtorno de ansiedade social

Transtorno do pânico

Agorafobia

Transtorno de ansiedade generalizada

Transtorno de ansiedade induzido por substância/medicamento

Transtorno de ansiedade devido a outra condição médica

Outro transtorno de ansiedade especificado

Transtorno de ansiedade não especificado

---

FONTE: DSM-V (2014)

Para o presente estudo, um tipo de ansiedade patológica é de interesse: o Transtorno de Ansiedade Generalizada (TAG), que pode ser definido como um estado de ansiedade excessiva ou apreensão com duração de mais de seis meses, associado à dificuldade no controle da preocupação. Esta preocupação está associada à pelo

menos três dos seguintes sintomas: inquietação ou sensação de estar com os nervos à flor da pele, fadigabilidade, dificuldade em concentrar-se ou sensações de “branco” na mente, irritabilidade, tensão muscular e perturbação do sono (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2014).

## **1.2. Reações de defesa e ansiedade**

Considerado um estado afetivo de difícil delimitação teórica, o estudo sistemático da ansiedade e do medo tomou grande impulso a partir dos trabalhos originais de Charles Darwin publicados em seu livro *The Expression of the Emotions in Man and Animals* (1872). Desde então, a abordagem evolucionária proposta por Darwin tem permeado muitas das teorias sobre a função e a importância que as emoções desempenham para as diferentes espécies.

Do ponto de vista biológico, a ansiedade possui suas raízes nas reações de defesa dos animais, verificadas em resposta aos perigos comumente encontrados no ambiente em que vivem (GRAEFF; BRANDÃO, 1999).

Diversos estudos sobre a neurobiologia do medo e da ansiedade demonstraram que a natureza das respostas de medo em animais expostos a situações ameaçadoras depende da intensidade e da distância do estímulo aversivo. Apesar do comportamento defensivo variar de uma espécie para outra, algumas estratégias comportamentais são adotadas em função dos diferentes níveis de ameaça com os quais os animais se deparam na natureza (GRAEFF; BRANDÃO, 1999). Estes comportamentos defensivos evoluíram porque melhoram a chance de sobrevivência de um animal em confrontos com algum tipo de ameaça, em particular, à ameaça de predadores ou até mesmo do ataque de membros da mesma espécie (BLANCHARD, 1997).

Neste sentido, os pesquisadores Caroline e Robert Blanchard (1989) identificaram as estratégias defensivas adotadas pelo animal de acordo com o nível de ameaça ao qual os roedores são expostos, que pode ser potencial, distal ou proximal.

Tais estímulos ameaçadores potenciais ou distantes induzem o aumento das respostas de avaliação de risco e de um estado alerta e vigilante, e quando o perigo é explícito, porém distante, o animal assume uma postura imóvel, além de reações autonômicas e neurovegetativas características da resposta de congelamento.

Assumindo esta postura de congelamento, o animal pode não ser percebido pelo predador. Porém, à medida que o predador se aproxima, ou aumenta a intensidade dos sinais que indicam sua presença, o comportamento de defesa se altera de um congelamento intenso para um comportamento de luta ou fuga, quando esta é possível (BLANCHARD; BLANCHARD, 1989; BRANDÃO et al., 2003).

Geralmente, estas respostas defensivas são acompanhadas de intensas alterações autonômicas como dilatação da pupila, piloereção, micção, defecação, exoftalmia, aumento da vigilância e atenção, alteração da frequência respiratória e cardíaca, alteração da pressão sanguínea, aumento da irrigação sanguínea dos músculos esqueléticos, que dão o suporte fisiológico necessário ao desempenho motor na reação de defesa (GRAEFF; BRANDÃO, 1999; LITVIN et al., 2007).

Além das estratégias comportamentais, os trabalhos de Caroline e Robert Blanchard relacionaram diversas estruturas encefálicas com os diferentes níveis de ameaças. Dessa forma o primeiro nível, representado pela avaliação de risco, está associado a amígdala e o sistema septo-hipocampal. O segundo nível, tendo como respostas a fuga e/ou congelamento tem a participação da amígdala e a substância cinzenta periaquedutal ventral (SCPV). Já no último nível de ameaça os comportamentos preferencialmente observados são fuga, ameaça defensiva ou respostas de agressão defensiva e tem como principal substrato neural a substância cinzenta periaquedutal dorsal (SCPD) (BLANCHARD et al., 1993; GRAY; MCNAUGHTON, 2000). Em trabalhos posteriores McNaughton e Corr (2004) sugerem que essas estruturas encefálicas participam em todos os níveis de ameaça, porém organizadas numa hierarquia funcional, com maior atuação das estruturas rostrais em ameaças potenciais e de estruturas caudais nas respostas de luta e fuga.

Das estruturas encefálicas envolvidas em diferentes tipos de emoções, o sistema constituído pela amígdala, hipotálamo e substância cinzenta periaquedutal (SCP), conhecido como sistema cerebral de defesa, é o mais conhecido e estudado (ETKIN, 2012; GRAEFF; GUIMARÃES, 2012; HETEM; GRAEFF, 2012).

### **1.3. Substância cinzenta periaquedutal dorsal e ansiedade**

A substância cinzenta periaquedutal (SCP) é a parte da substância cinzenta periventricular no mesencéfalo que circunda o aqueduto mesencefálico, sendo que sua parte mais rostral está ao nível da comissura posterior e, a parte mais caudal, ao nível do núcleo tegmental dorsal (BEHBEHANI, 1995). É subdividida anatômica e funcionalmente em quatro colunas neuronais que se estendem ao longo do eixo rostrocaudal e são denominadas em dorsomedial, dorsolateral, lateral e ventrolateral. Funcionalmente, esta subdivisão baseia-se nas respostas somatomotoras, cardiovasculares e analgésicas seguidas de sua estimulação elétrica ou química (BANDLER; CARRIVE; DE PAULIS, 1991; BANDLER et al., 2000; CARRIVE, 1993). A SCP é considerada uma estrutura cerebral bastante complexa, pois é inervada por uma abundante rede de vias aferentes e eferentes. Esta profusa inervação da SCP estaria de acordo com a participação dessa estrutura na integração de muitas funções fundamentais para a sobrevivência do organismo, tais como o processamento e a modulação da informação dolorosa, a mediação do controle motor, do controle cardiovascular e de respostas de medo e ansiedade (BANDLER; SHIPLEY, 1994; BEITZ, 1990, 1995; BEITZ et al., 1986; CAMERON et al., 1995; MANTYH, 1987; VEENING et al., 1991).

Existem evidências que indicam um papel importante da substância cinzenta periaquedutal dorsal, que compreende as colunas dorsomedial e dorsolateral, no medo e na ansiedade. Por possuir várias inervações aferentes e eferentes nesta estrutura, existem vários neurotransmissores envolvidos na modulação destes comportamentos aversivos (BANDLER; SHIPLEY, 1994; BEIJAMINI; GUIMARÃES, 2006; BRANDÃO et al., 2008; DE OLIVEIRA; DEL BEL; GUIMARÃES, 2000; FERREIRA-NETTO; BORELLI; BRANDÃO, 2005; GOMES, 2010; GRAEFF, 1990, 1994, 1999; ZANOVELI; NOGUEIRA; ZANGROSSI, 2003; ZANOVELI et al., 2004). Entre estes neurotransmissores estão a serotonina, a colecistocinina, o GABA, o glutamato e a noradrenalina (BRANDÃO et al., 1994; GRAEFF, 1994, 1999; GRAEFF; VIANA; MORA, 1997; GRAEFF et al., 1993; GUIMARÃES et al., 1991; NUTT; GEORGE, 1990; TEIXEIRA; CAROBREZ, 1999; ZANOVELI; NOGUEIRA; ZANGROSSI, 2003; ZANOVELI et al., 2004; PELOSI et al., 2009; ESTRADA et al., 2016). Assim, Netto e Guimarães (2004) mostraram que a administração de colecistocinina na SCPD modula as reações de ansiedade, apresentando efeito do

tipo ansiogênico. Do mesmo modo, a administração de glicina na SCPD também induz efeito do tipo ansiogênico (SCHIMITT et al., 1995). Além disso, existem interações entre os receptores na SCPD que podem modular as reações de ansiedade, como mostrado por De Souza e colaboradores (1998) que sugerem que NMDA ligado à receptores de glicina localizados na SCPD interferem nos efeitos de fármacos que atuam em receptores GABA-A em animais testados no labirinto em cruz elevado.

Um dos modelos experimentais utilizado para avaliar a participação da SCPD na ansiedade é o labirinto em T elevado (LTE) (CAMPLESI et al., 2012; DE PAULA SOARES; ZANGROSSI, 2004; ESTRADA et al., 2016; ZANOVELI et al., 2003). Este modelo animal, derivado do labirinto em cruz elevado (LCE) (HANDLEY; MITHANI, 1984) permite avaliar, em um mesmo rato, a resposta de esquiva inibitória (saída do braço fechado) e resposta de fuga (saída do braço aberto). Após extensa validação farmacológica do LTE, a resposta de fuga deste teste tem sido associada com o transtorno de pânico, enquanto a esquiva inibitória relaciona-se com o transtorno de ansiedade generalizada (GRAEFF; VIANA; TOMAZ, 1993; VIANA; TOMAZ; GRAEFF, 1994; GRAEFF; NETTO; ZANGROSSI, 1998; TEIXEIRA; ZANGROSSI; GRAEFF, 2000; POLTRONIERI; ZANGROSSI; VIANA, 2003). Neste sentido, estudo realizado por Zanolli e colaboradores (2003) mostrou que a injeção intra-SCPD de agonista de receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT<sub>1A</sub> facilitou a saída do braço fechado (resposta de esquiva inibitória) quando os animais foram testados no LTE, sugerindo um efeito do tipo ansiolítico. Por outro lado, injeções intra-SCPD de agonista de receptores 5-HT<sub>2</sub> e o agonista endógeno serotonina (5-HT) facilitaram a esquiva inibitória no LTE, sugerindo um efeito do tipo ansiogênico.

De particular interesse para este trabalho, a noradrenalina, um neurotransmissor da maioria das fibras simpáticas, junto da dopamina e a epinefrina compõem o grupo das catecolaminas (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012).

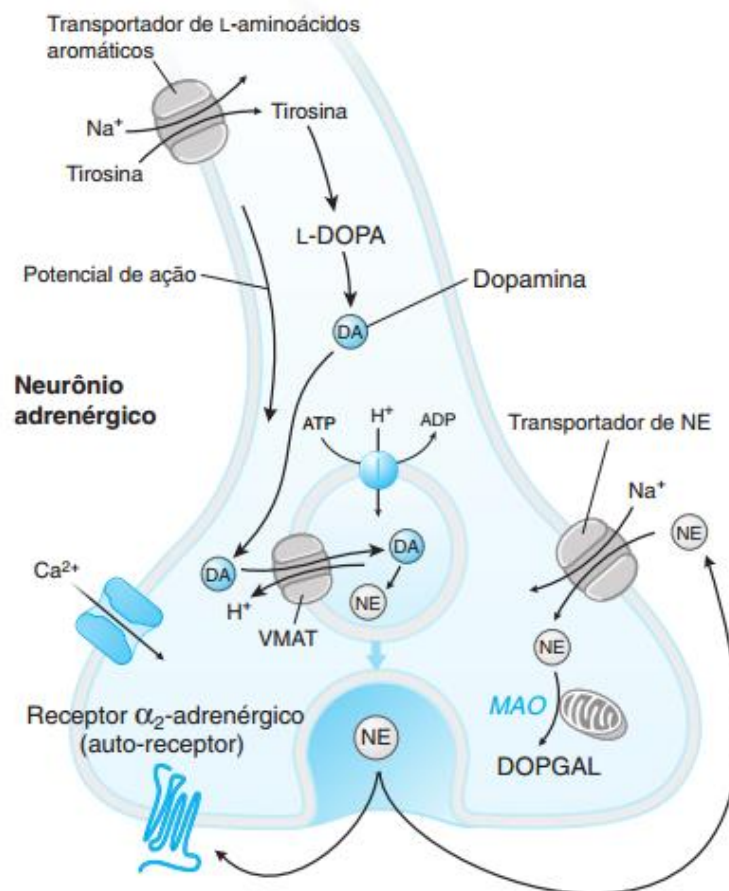
#### **1.4. Sistema noradrenérgico e ansiedade**

O sistema noradrenérgico modula a vigilância, as respostas ao estresse, a função neuroendócrina, o controle da dor e a atividade do sistema nervoso simpático. A liberação de NA ocorre primariamente através de varicosidades. Ao contrário das sinapses, que formam contatos firmes com neurônios-alvo específicos, as

varicosidades liberam grandes quantidades de neurotransmissor a partir de vesículas presentes no espaço extracelular, estabelecendo gradientes de concentração de neurotransmissor nas áreas de projeção das varicosidades. As células que contêm NA no *locus coeruleus* projetam-se amplamente através do córtex cerebral. Cada um desses sistemas possui auto-receptores pré-sinápticos proeminentes, que controlam as concentrações locais de transmissores. Essa autoregulação resulta em descarga coordenada, produzindo ondas espontâneas e sincrônicas de atividade, que podem ser medidas como frequências de descarga. Como a frequência de descarga não se modifica rapidamente, e os quanta de transmissor liberado em cada descarga são razoavelmente bem conservados, a concentração de neurotransmissor nas proximidades das varicosidades é mantida dentro de uma estreita faixa. A concentração média estabelece o tônus basal de atividade nos neurônios-alvo que recebem projeções de NA. Além disso, estímulos específicos podem provocar rápidos surtos de descarga, superpostos à atividade tônica basal, fornecendo informações adicionais. Por conseguinte, os sistemas de projeção difusos podem fornecer dois tipos de informação: uma descarga neuronal rápida e distinta, semelhante à neurotransmissão mais tradicional, e uma frequência de descarga tônica mais lenta, que presumivelmente proporciona uma integração da informação no decorrer de um maior período de tempo.

A NA é transportada em vesículas por intermédio do transportador de monoaminas vesicular (VMAT, vesicular monoamine transporter), um transportador inespecífico de monoaminas. Os transportadores da recaptação seletiva de monoaminas são proteínas que atravessam doze vezes a membrana e que acoplam o transporte do neurotransmissor ao gradiente de sódio transmembrana. Ao contrário do VMAT, que é um transportador inespecífico de monoaminas, os transportadores de recaptação de monoaminas exibem seletividade, alta afinidade e baixa capacidade para cada monoamina específica. Os transportadores seletivos de monoaminas, que incluem o transportador de serotonina (SERT), o transportador de norepinefrina (NET) e o transportador de dopamina (DAT). Quando a NA retorna ao citoplasma neuronal, o neurotransmissor é transportado em vesículas através do VMAT ou sofre degradação pelo sistema de monoamina oxidase (MAO). As MAO são enzimas mitocondriais que regulam os níveis de monoaminas nos tecidos neurais e que inativam as monoaminas (como a tiramina) circulantes e dietéticas no fígado e no intestino. As duas isoformas,

a MAO-A e a MAO-B, diferem de acordo com a especificidade de substrato: a MAO-A oxida a 5HT, a NA e a DA, enquanto a MAO-B oxida preferencialmente a DA. A catecol-O-metiltransferase (COMT) no espaço extracelular é outra enzima importante de degradação das monoaminas, embora a COMT desempenhe um papel menos significativo no SNC do que na periferia (NADAL-VICENS; CHYUNG; TURNER, 2009).



**Figura 1-** Regulação pré-sináptica da neurotransmissão da noradrenalina (NADAL-VICENS; CHYUNG; TURNER, 2009)

Os receptores adrenérgicos  $\alpha$  e  $\beta$  são membros de uma grande família de receptores positivamente acoplados à proteína G. Esses receptores são subdivididos em  $\alpha_{1a}$ ,  $\alpha_{1b}$ ,  $\alpha_{1d}$ ,  $\alpha_{2a}$ ,  $\alpha_{2b}$ ,  $\alpha_{2c}$  (FITZGERALD, 2007),  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  e  $\beta_3$  (COLLINS; SURWIT, 2005). Tais receptores são proteínas transmembranas com uma porção amino terminal extracelular e uma porção carboxi terminal intracelular. Apresentam sete regiões hidrofóbicas que atravessam a membrana celular. Através dessas regiões, os subtipos de receptores adrenérgicos exibem aminoácidos homólogos e diferenças nos

segmentos 50 e 60 que determinam a especificidade do encaixe de agonistas (FITZGERALD, 2007). Estão envolvidos em diversos processos fisiológicos, tais como o desenvolvimento, comportamento, tônus do músculo liso, funcionamento cardíaco e metabolismo energético (JIMENEZ et al, 2002).

Os receptores alfa-1 estão presentes na membrana pós-sináptica de órgãos efetadores e sua ativação inicia uma série de reações através da ativação de fosfolipase C via proteína G. Os efeitos mediados por este receptor incluem: vasoconstrição, aumento da resistência periférica, aumento da pressão arterial, midríase e estímulo da contração do esfíncter superior da bexiga. Já os receptores alfa-2 estão localizados essencialmente nas terminações nervosas pré-sinápticas e em outras células. Os efeitos mediados por este receptor incluem inibição da liberação de noradrenalina e inibição da liberação de insulina. Os receptores beta são receptores pós-sinápticos, presentes em diversas partes do organismo humano, tais como, coração, rins, vasos sanguíneos do músculo esquelético e musculatura lisa bronquial. Os receptores beta-1 causam taquicardia, aumento da lipólise e aumento da contratilidade do miocárdio. Já os receptores beta-2 provocam vasodilatação, pequena diminuição da resistência periférica, broncodilatação, aumento da glicólise hepática, aumento da liberação de glucagon e relaxamento da musculatura lisa uterina (BRUNTON, 2008; KATZUNG, 2007).

Com relação à participação do sistema noradrenérgico na ansiedade, as evidências existentes são conflitantes. Alguns estudos sugerem que a noradrenalina apresenta efeito ansiogênico. Neste sentido, a microinjeção do antagonista seletivo alfa-1 noradrenérgico benoxatian no núcleo central da amígdala mostrou que o antagonismo desse receptor atenuou a resposta de ansiedade induzida pelo stress agudo em animais expostos ao modelo de interação social (CECCHI et al., 2002a). Ainda, foi observado que a depleção noradrenérgica no encéfalo produz efeitos ansiolíticos (LAPIZ et al., 2001; MCNAUGHTON; MASON, 1980).

Por outro lado, tem sido sugerido um efeito ansiolítico da noradrenalina. Em modelos experimentais de conflito como o LCE e o teste de Vogel, a administração intra-SCPD de noradrenalina apresentou efeito o tipo ansiolítico (PELOSI et al., 2009). Além disso, estudo publicado recentemente (ESTRADA et al., 2016) e resultados prévios do nosso laboratório (CARVALHO, 2016; não publicados) mostram um efeito do tipo ansiolítico



da noradrenalina injetada diretamente na SCPD quando os animais são testados no labirinto em T elevado. Adicionalmente, observa-se a eficácia clínica nos transtornos de ansiedade dos antidepressivos tricíclicos e inibidores da enzima monoaminoxidase (iMAO) os quais atuam, em parte, por facilitar os efeitos da noradrenalina (KLEIN, 1964; KLEIN; FINK, 1962; YAMADA; YASUHARA, 2004).

Efeitos ansiolíticos similares também são observados com a utilização de inibidores seletivos da recaptação neuronal de noradrenalina (BRUNELLO et al., 2003). Apesar destas drogas aumentarem agudamente os níveis de noradrenalina, mudanças adaptativas no número e/ou responsividade dos receptores noradrenérgicos poderiam ter um papel importante nestes efeitos (BRUNELLO et al., 2003; MORILAK; FRAZER, 2004).

Neophytou e colaboradores (2001) mostraram que lesões químicas, utilizando oxidopamina (composto orgânico neurotóxico sintético utilizado para destruir seletivamente neurônios dopaminérgicos e noradrenérgicos) no *locus coeruleus*, reduziu os níveis de noradrenalina na substância cinzenta periaquedutal dorsal e reduziu a duração do *freezing*, uma resposta de defesa observada no medo condicionado e medo incondicionado induzido por ultrassom.

O *locus coeruleus* contém um alto nível de noradrenalina (SAAVEDRA et al., 1979) e envia projeções noradrenérgicas para várias regiões encefálicas relacionadas com o medo e a ansiedade, entre elas o córtex pré-frontal e entorinal, hipocampo, amígdala, hipotálamo, tálamo, núcleo do trato solitário e de especial interesse para o presente trabalho, a substância cinzenta periaquedutal (FUXE, 1965; HSIAO; POTTER, 1990; SCHENBERG et al., 2001; SULLIVAN et al., 1999).

Dentro deste contexto, os estudos acima reforçam o envolvimento do sistema noradrenérgico na neurobiologia dos transtornos de ansiedade.

Apesar da presença da noradrenalina nas terminações nervosas da SCP (FUXE, 1965; VERSTEEG et al., 1976) e considerando os resultados conflitantes em relação ao papel noradrenérgico na ansiedade, o presente trabalho busca elucidar a ação desse neurotransmissor na SCPD e os receptores envolvidos, utilizando outro modelo de ansiedade, o teste de transição claro-escuro.

## 1.5. Modelos animais de ansiedade

Os modelos animais de ansiedade foram criados com a finalidade de estudar as alterações fisiológicas humanas, já que os padrões comportamentais e as reações fisiológicas ativadas em consequência do contato com fontes sinalizadoras de perigo em potencial dos animais apresentam grande correspondência com as medidas de ansiedade em humanos. Estas fontes sinalizadoras de perigo incluem a exposição de animais a ambientes novos ou potencialmente perigosos, presença de um predador natural ou confrontos iminentes com animais da mesma espécie (CRUZ et al., 2012). Na tabela 2 estão relacionados os principais modelos etológicos de ansiedade utilizados, bem como o princípio do modelo e os parâmetros analisados.

Tabela 2- Modelos animais de ansiedade

<b>Modelo experimental de ansiedade</b>	<b>Princípio do modelo e parâmetros analisados</b>
Interação social em ratos	<p>Baseia-se nos diferentes comportamentos que pares de ratos machos realizam em uma arena iluminada.</p> <p>Parâmetros: A frequência e o tempo gasto pelo par de machos em diferentes tipos de interação social.</p>
Vocalização ultrassônica	<p>Filhotes de ratos produzem vocalizações ultrassônicas quando separados de suas mães e irmãos. Estes são colocados em isolamento em ambiente quente (37°C) ou frio (18°C) por cinco minutos.</p> <p>Parâmetros: O número total e a duração das vocalizações ultrassônicas emitidas pelos filhotes.</p>
Labirinto em cruz elevado	<p>Conflito entre a tendência natural de roedores de explorar ambientes novos e a</p>

---

	aversão o medo natural que ratos apresentam a altura e espaços abertos.
	Parâmetros: Porcentagens de entrada e tempo gasto nos braços abertos.
Labirinto em T elevado	Aversão inata que ratos e camundongos apresentam a espaços abertos e altos. Parâmetros: Latência de fuga e latência para saída do braço fechado.
Transição claro-escuro	O modelo baseia-se na aversão inata que os roedores têm por áreas iluminadas.  Parâmetros: Número de transições entre o compartimento claro e escuro, a latência para a primeira entrada no compartimento escuro e o tempo de permanência no compartimento claro.

---

Fonte: Adaptado de CRUZ et al., 2012

### **1.6. Teste de transição claro-escuro**

O teste de transição claro-escuro é baseado no modelo inicial descrito por Crawley e Goodwin, em 1980. Tem como princípio o ponto de vista etológico, na propensão do animal de exploração em um espaço desconhecido. A situação de conflito é gerada pela tendência do animal em explorar e, ao mesmo tempo, evitar lugares iluminados. É um modelo rápido e de simples instrumentação, além de não requerer protocolos de treinamento do animal.

Ao longo do tempo, o modelo original sofreu várias modificações, que vão desde alterações estruturais, tais como o tamanho da caixa (COSTALL et al., 1988a, 1988b; GAO; CUTLER, 1992; YOUNG; JOHNSON, 1988) e a inclusão de um corredor entre os dois compartimentos (BELZUNG et al., 1987), bem como modificações no protocolo de experimento, havendo alterações por exemplo, no tempo de duração do teste (SHIMADA et al., 1995).

Fármacos benzodiazepínicos, como o diazepam, o alprazolam e o clordiazepóxido (MERLO PICH; SAMANIN, 1989; CHAUOFF et al., 1997; HASCOET; BOURIN, 1998), bem como agonistas de receptores serotoninérgicos do tipo 5HT<sub>1A</sub>, como a buspirona, apresentam efeito ansiolítico no modelo de transição claro-escuro (SANCHÉS, 1996; HENDRIE et al., 1997; GRIEBEL et al., 1998). Por outro lado, drogas que atuam sobre a inibição da recaptação de monoaminas como a imipramina (MERLO PICH; SAMANIN, 1989; DE ANGELIS, 1996) e a fluoxetina (DE ANGELIS, 1996; SANCHÉS; MAIER, 1997) apresentam efeitos contraditórios no modelo, mostrando tanto efeito ansiolítico, como ansiogênico ou até ausência de efeitos na ansiedade.

Os parâmetros mais utilizados para análise da ansiedade no teste de transição claro-escuro são o tempo de latência para a primeira entrada no compartimento escuro, o número de transições e o tempo de permanência no compartimento claro. Já os movimentos em cada compartimento são utilizados para avaliação da atividade locomotora dos animais (CRAWLEY; GODWIN, 1980; COSTALL et al, 1988a, 1988b; GAO e CUTLER, 1992; YOUNG e JOHNSON, 1988; BELZUNG et al, 1987; SHIMADA et al, 1995; MERLO PICH; SAMANIN, 1989; CHAUOFF et al., 1997; HASCOET; BOURIN, 1998).

## **2. OBJETIVO**

### **2.1. Geral**

Investigar a participação do sistema noradrenérgico da substância cinzenta periaquedutal dorsal na modulação de comportamentos defensivos relacionados à ansiedade no modelo de transição claro-escuro.

### **2.2. Específicos**

- Testar a hipótese de que a noradrenalina administrada diretamente na SCPD apresenta efeito do tipo ansiolítico em animais expostos ao teste de transição claro-escuro.
- Verificar o envolvimento de receptores alfa-adrenérgicos da SCPD nos efeitos da noradrenalina em animais expostos ao teste de transição claro-escuro através do pré-tratamento intra-SCPD do antagonista não-seletivo fentolamina.
- Verificar o envolvimento de receptores beta-adrenérgicos da SCPD nos efeitos da noradrenalina em animais expostos ao teste de transição claro-escuro através do pré-tratamento intra-SCPD do antagonista não-seletivo propranolol.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Animais

Foram utilizados ratos Wistar, experimentalmente ingênuos, provenientes do Biotério Central do campus de Maruípe da Universidade Federal do Espírito Santo, com peso entre 220-250 g. Os animais foram mantidos em caixas comunitárias no laboratório de bioexperimentação do campus de São Mateus da Universidade Federal do Espírito Santo, com livre acesso à água e comida, sob um ciclo de luz claro/escuro de 12 horas (luzes acesas às 7:00 horas) e temperatura controlada em  $23 \pm 1$  °C.

Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFES), sob o número 046/2014.

#### 3.2. Drogas

As seguintes drogas foram utilizadas:

- **Associação antibiótica de amplo espectro:** pentabiótico de uso veterinário para animais de pequeno porte (Forte Dodge, Brasil).
- **2,2,2 tribromoetanol** (Sigma-Aldrich, EUA).
- **Banamine®** (Flunixinina meglumina): anti-inflamatório não esteroide (Schering e Plough; Brasil).
- **Cloral hidratado** (Sigma-Aldrich, Brasil).
- **Cloridrato de dl-noradrenalina** (Sigma-Aldrich, EUA).
- **Cloridrato de lidocaína:** anestésico local associado a um vasoconstritor (DFL, Brasil).
- **Fentolamina:** antagonista não-seletivo para receptores alfa (Sigma-Aldrich, EUA).
- **Propranolol:** antagonista não-seletivo para receptores beta (Sigma-Aldrich, EUA).

A noradrenalina e os antagonistas noradrenérgicos foram dissolvidos em salina estéril a 0,9%.

### **3.3. Aparelhos experimentais**

#### **3.3.1. Caixa claro-escuro**

O aparelho (Figura 1) consiste em uma caixa de madeira com as dimensões de 32,0 x 28,5 x 46,0 cm, com dois compartimentos. O compartimento escuro possui 1/3 da dimensão total da caixa e foi escurecido com papel contact preto. A passagem entre as duas câmaras possui 7 cm de altura e 7 cm de largura. O aparelho possui uma tampa de madeira no compartimento escuro e uma tampa de acrílico no compartimento claro. A iluminação do compartimento claro era a iluminação da sala, e o compartimento escuro não possuía nenhuma iluminação.



**Figura 2-** Caixa claro-escuro

### 3.3.2. Campo aberto

O campo aberto consiste em uma arena quadrada medindo 60 x 60 cm, com paredes laterais de 40 cm de altura (Figura 2), utilizada para quantificar a atividade locomotora dos animais após o teste de transição claro-escuro. A arena foi dividida em 9 quadrantes medindo 20 x 20 cm cada.



**Figura 3-** Campo aberto

## 3.4. Procedimentos

### 3.4.1. Cirurgia

Os animais foram anestesiados com 2,2,2 tribromoetanol (Sigma-Aldrich, EUA) à 2,5% por via intraperitoneal, na dose de 1 mL/100 g. Para melhorar o campo de visão da cirurgia, realizou-se uma tricotomia na região cirúrgica.

Os animais foram então adaptados a um aparelho estereotáxico (Insight, Brasil), com a barra dos incisivos 2,4 mm abaixo da linha interaural. O campo cirúrgico, assim como o local da injeção do anti-inflamatório e do multibiótico foram limpos com iodo à 1%. Em seguida, foi administrado na região da incisão o anestésico local cloridrato de



lidocaína associado a um vasoconstritor (DFL, Brasil), por via subcutânea, além de 0,2 mL/animal (i.m.) de uma associação antibiótica de amplo espectro (pentabiótico de uso veterinário para animais de pequeno porte; Forte Dodge, Brasil) e 0,2 mL/animal de flunixinina meglumina (Banamine®; Schering e Plough, Brasil; 2,5 mg/kg, via subcutânea), um fármaco com propriedades analgésica, antipirética e anti-inflamatória. Após a administração dos medicamentos, foi realizada uma incisão para expor a calvária e remover o periósteo.

Na sequência, foram então perfurados na calvária dois orifícios com uma broca dental utilizando um micromotor (Beltec, Brasil) para a introdução de parafusos de aço inoxidável, com a finalidade de prender a prótese de acrílico ao crânio. Outro orifício foi perfurado, 1,9 mm lateral à linha interaural e 1,6 mm antero-posteriormente à linha interaural para a introdução da cânula-guia. Esta cânula foi confeccionada a partir de uma agulha hipodérmica descartável (25 x 6 mm) e tinha o comprimento de 13 mm. A cânula-guia foi fixada ao estereotáxico e introduzida à uma profundidade de 3,8 mm abaixo da superfície craniana, com uma inclinação de 15° em relação ao plano sagital, evitando-se assim, a perfuração do seio venoso. Tais coordenadas foram adaptadas do atlas de Paxinos e Watson (2007). Após o implante, a cânula foi fixada à calota craniana por meio de resina dental autopolimerizável. Para evitar a obstrução da cânula, foi introduzido um mandril de 13 mm, que nada mais é do que uma linha de aço inox de 0,30 mm de espessura, dentro da cânula-guia e também fixado com a resina dental autopolimerizável. Após a cirurgia, os animais foram retornados ao laboratório de bioexperimentação, onde permaneciam até a realização dos testes comportamentais.

### **3.4.2. Injeção intracerebral**

As drogas ou a salina foram administradas na SCPD por meio de uma agulha dental, 0,3 mm de diâmetro externo e 14 mm de comprimento, introduzida na cânula-guia. A ponta da agulha dental alcançava o tecido cerebral localizado a 1 mm abaixo da extremidade inferior da cânula-guia. A agulha foi conectada a uma microseringa Hamilton de 10 µL através de um segmento de polietileno (P10). A fim de garantir que a dose fosse realmente administrada, era feita uma bolha de ar no polietileno seguido da aspiração da droga. O deslocamento da bolha de ar no momento da injeção indicava que a droga havia sido administrada corretamente. A administração das

drogas foi realizada com auxílio de uma bomba de infusão (Insight, Brasil), com um volume de 0,10  $\mu$ L (CRESTANI et al., 2008) durante 15 segundos para todas as drogas. Para evitar o refluxo da droga, a agulha permanecia na posição de injeção durante os 30 segundos subseqüentes. Durante a injeção, os animais permaneciam com livre movimentação em uma caixa com serragem no assoalho. As doses para realização da curva dose-resposta da noradrenalina foram selecionadas com base em resultados prévios mostrando efeitos do tipo ansiolítico da noradrenalina no labirinto em T elevado. Para a curva dose-resposta do nosso trabalho, excluimos a menor dose (10 nmols) pois não foi encontrado efeito significativo e incluímos uma dose maior (90 nmols) (CARVALHO et al., 2016). A dose do antagonista beta-adrenérgico propranolol foi baseada no estudo de Alves e colaboradores (2011) e a dose do antagonista alfa-adrenérgico fentolamina foi escolhida com base no trabalho de Hott e colaboradores (2012).

### **3.4.3. Testes comportamentais**

#### **3.4.3.1. Habituação**

Após 5 a 7 dias do procedimento cirúrgico, pela manhã, os animais foram levados para a sala de teste a fim de serem habituados às condições experimentais. A sala de experimento possui condições semelhantes às condições do biotério (ciclo claro/escuro de 12 horas e temperatura de  $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ). Os animais foram manuseados, individualmente, pelo experimentador por 5 minutos e em seguida colocados em uma caixa com serragem no assoalho. O mesmo procedimento era repetido no período da tarde (RAUD et al., 2005).

#### **3.4.3.2. Teste de transição claro-escuro**

No dia seguinte à habituação, os animais foram submetidos ao teste de transição claro-escuro (JORGE et al., 2004).

Imediatamente após a injeção intra-SCPD, cada animal foi colocado no centro do compartimento claro da caixa com a face voltada para a entrada do compartimento escuro e a partir do momento que o animal cruzava com as quatro patas para o compartimento escuro, o tempo começava a ser cronometrado durante cinco minutos. Após o teste de cada animal, o campo aberto era limpo com álcool a 20 %.

Todo o procedimento era gravado para análise posterior. Os animais que permaneciam por mais de cinco minutos sem realizar a primeira transição eram excluídos do teste.

Os parâmetros analisados neste teste foram a latência para a primeira entrada, o número de cruzamentos e o tempo de permanência no compartimento claro.

A latência para a primeira entrada consiste no tempo que o animal demora para entrar no compartimento e realizar a primeira transição. Já o número de cruzamentos é contado pela passagem do animal pelos compartimentos com as quatro patas e o tempo de permanência no compartimento claro é medido pelo tempo que o animal permanece neste compartimento.

#### **3.4.3.3. Campo aberto**

Imediatamente após o teste de transição claro-escuro cada animal era colocado no campo aberto para a observação da atividade locomotora que foi medida por meio do número de quadrantes cruzados pelo animal durante o período de 5 minutos. Após o teste de cada animal, o campo aberto era limpo com álcool a 20 %.

Este teste é utilizado principalmente para mensurar o comportamento locomotor e exploratório em animais experimentais, uma vez que há uma facilidade para realização do registro comportamental. Neste caso, o animal se locomove com o intuito de explorar um novo ambiente, e essa movimentação é mensurada, sendo, portanto, um indicador de atividade exploratória (HALL, 1941).

No teste, os animais são posicionados no quadrante central e podem explorar a caixa livremente.

#### **3.4.4. Perfusão e histologia**

Após o término dos testes comportamentais, os animais foram anestesiados com uretana 25% por via intraperitoneal e através da mesma cânula pela qual foi administrada a droga foi injetado o volume de 0,1 µL do corante Azul de Evans a 1 %. Em seguida, os animais sofreram perfusão intracardíaca com salina seguida de uma solução de formol a 10 %. Os encéfalos perfundidos foram fixados em formol a 10 % até serem cortados em secções coronais de 55 µm de espessura por meio de um criostato (Leica Biosystems, Brasil) no Laboratório de Histologia Molecular e

Imunohistoquímica (LHMI) da UFES. Os cortes foram preparados em lâminas de microscopia e analisados a fresco com o auxílio de um microscópio para localização do sítio de injeção, segundo as fotomicrografias do atlas de Paxinos e Watson (2007). Foram utilizados somente os dados dos animais que tiveram os sítios de injeção localizados na SCPD.

### **3.5. Grupos experimentais e procedimentos**

#### **3.5.1. Experimento 1: Curva dose-resposta da noradrenalina**

Os animais foram divididos em 4 grupos: O grupo controle, que recebeu salina (n=10) e 3 grupos que receberam o agonista cloridrato de dl-noradrenalina (NA) em doses diferentes, NA 30 nmols (n=10), NA 60 nmols (n=10) e NA 90 nmols (n=11). Os animais foram submetidos ao teste de transição claro-escuro 30 segundos após a injeção intra-SCPD da noradrenalina ou salina. As doses da noradrenalina foram selecionadas com base em resultados prévios do nosso laboratório (CARVALHO, 2016) e também de Pelosi e colaboradores 2009.

#### **3.5.2. Experimento 2: Pré-tratamento intra-SCPD com antagonista não seletivo de receptores beta-adrenérgicos**

Os grupos experimentais foram: salina/salina (n=11), propranolol/salina (n=11), salina/noradrenalina (n=11) e propranolol/noradrenalina (n=12). A dose utilizada da noradrenalina nesse experimento foi de 30 nmols e a dose do antagonista propranolol foi de 10 nmols. A injeção do antagonista foi realizada 10 min antes da injeção da noradrenalina ou salina. Os animais foram submetidos ao teste de transição claro-escuro 30 segundos após a última injeção. A dose do propranolol foi selecionada com base em resultados prévios da literatura (ALVES, 2011).

#### **3.5.3. Experimento 3: Pré-tratamento intra-SCPD com antagonista não-seletivo de receptores alfa-adrenérgicos**

Os grupos experimentais foram: salina/salina (grupo controle; n=10), fentolamina/salina (n=10), salina/noradrenalina (n=9) e fentolamina/noradrenalina (n=10). A dose utilizada da noradrenalina neste experimento foi de 30 nmols e a dose do antagonista fentolamina foi de 10 nmols. A injeção do antagonista foi realizada 10 min antes da injeção da noradrenalina ou salina. Os animais foram submetidos ao teste de transição claro-escuro 30 segundos após a última injeção. A dose da

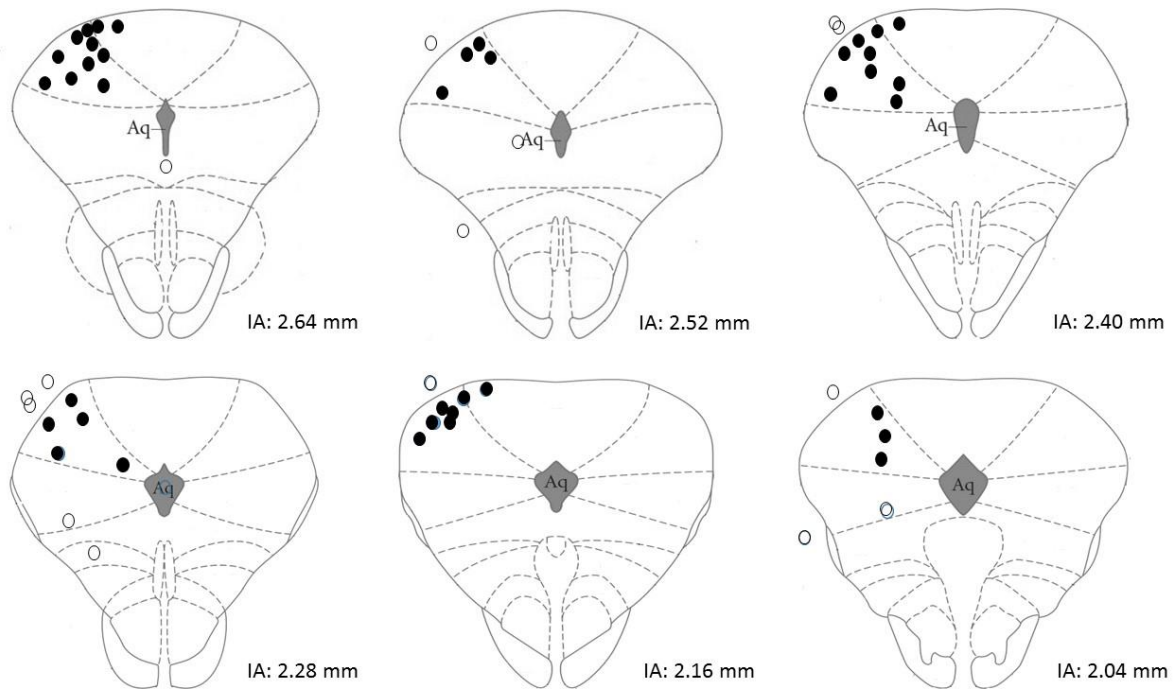
fentolamina foi selecionada com base em resultados prévios da literatura (HOTT et al., 2012).

### **3.6. Análise estatística**

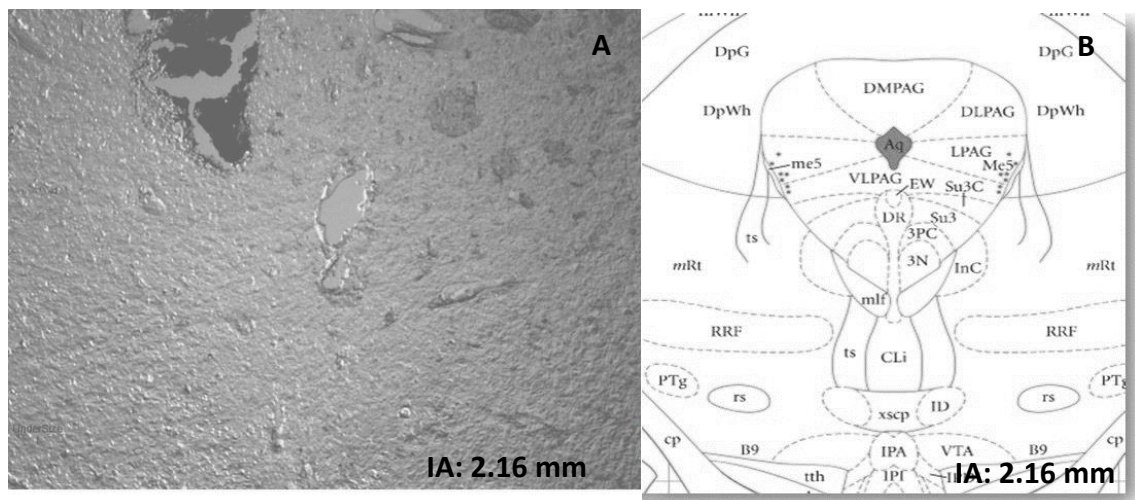
Os parâmetros analisados nesse teste incluem a latência para primeira entrada no compartimento escuro, o tempo de permanência no compartimento claro e o número de transições entre os compartimentos. A análise estatística foi realizada pelo programa IBM® SPSS® Statistics, versão 20 e todos os parâmetros no teste de transição claro-escuro e o número de cruzamentos no campo aberto foram submetidos a uma análise de variância de uma via (ANOVA) e ao teste *post hoc* de Tukey.

## 4. RESULTADOS

As figuras 3 e 4 representam os sítios de injeção de drogas na SCPD dos animais testados no presente estudo. Animais que tiveram a injeção fora da coluna dorsal foram excluídos das análises.



**Figura 4-** Representação esquemática de cortes coronais de encéfalos de ratos (Paxinos e Watson, 2007), mostrando os sítios de injeção na SCPD (●) dos animais testados nos experimentos 1, 2 e 3. Devido às sobreposições, o número de pontos representados é menor do que o número de animais tratados. Os círculos abertos (○) representam injeções fora da coluna dorsal. Aq: Aqueduto mesencefálico. IA: Interaural.



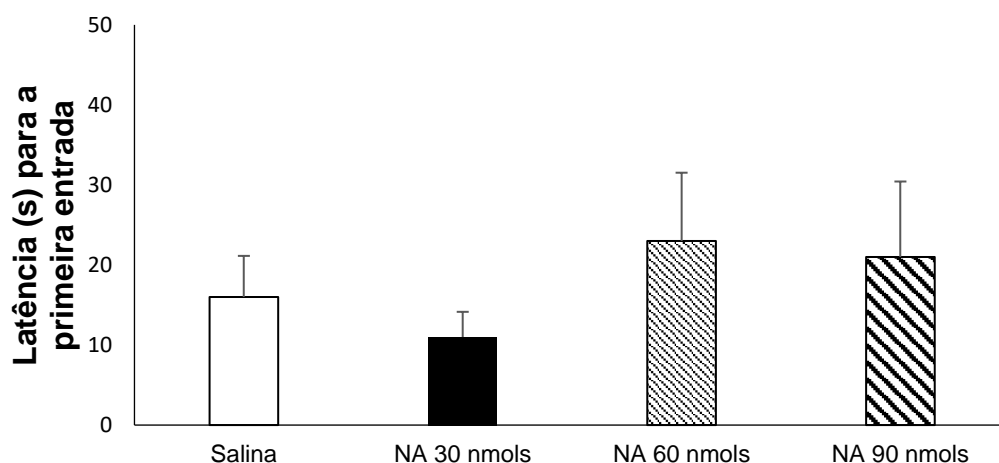
**Figura 5-** A: fotomicrografia de um sítio de injeção na SCPD. B: plano relativo a essa região no Atlas de Paxinos e Watson (2007).

#### 4.1. Experimento 1: Efeito da administração intra-SCPD de noradrenalina ou salina em ratos submetidos ao modelo de transição claro-escuro

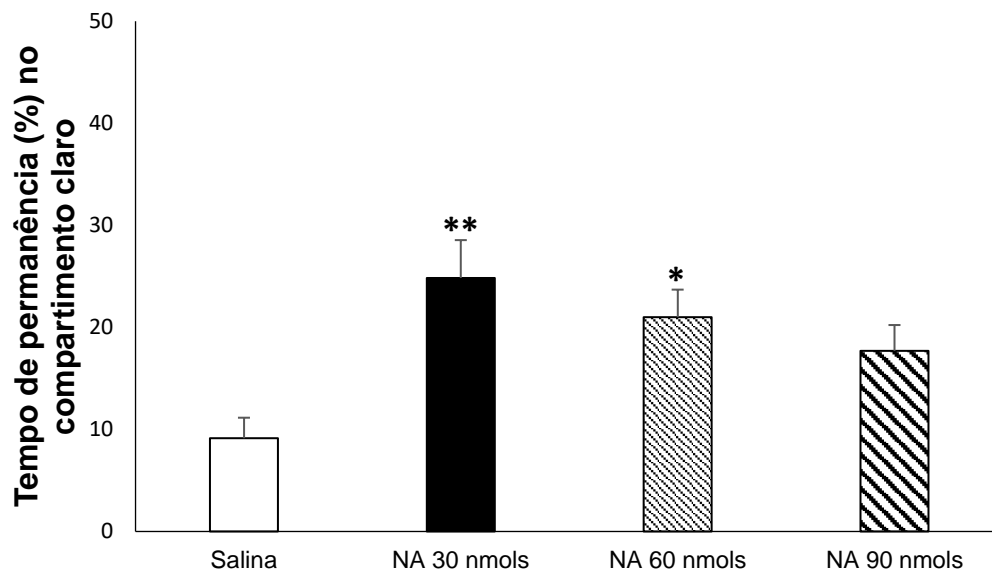
As figuras 6, 7 e 8 mostram os resultados obtidos com a administração intra-SCPD de diferentes doses de noradrenalina em comparação ao controle (salina) no modelo de transição claro-escuro nas medidas da latência (s) para a primeira entrada no compartimento escuro, no tempo de permanência no compartimento claro (%) e no número de transições entre os compartimentos, respectivamente.

A ANOVA de uma via não mostrou (figura 6) efeito significativo do tratamento na latência para a primeira entrada [ $F_{(3,40)} = 0,527$ ;  $p = 0,666$ ]. No entanto, a ANOVA de uma via revelou aumento significativo no tempo de permanência no compartimento claro nas doses de 30 [ $F_{(3,40)} = 5,502$ ;  $p = 0,002$ ] e 60 nmols [ $F_{(3,40)} = 5,502$ ;  $p = 0,032$ ] de noradrenalina e no número de transições entre os compartimentos claro e escuro, também nas doses de 30 [ $F_{(3,40)} = 5,822$ ;  $p = 0,001$ ] e 60 nmols [ $F_{(3,40)} = 5,502$ ;  $p = 0,04$ ], sugerindo efeito do tipo ansiolítico da noradrenalina, como ilustrado nas figuras 7 e 8, respectivamente.

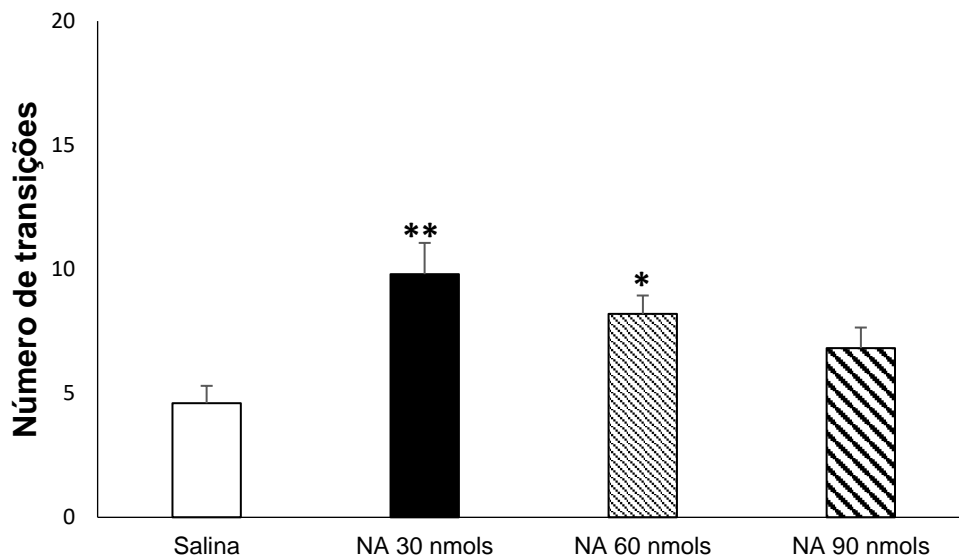
A tabela 3 apresenta os resultados obtidos no campo aberto. A ANOVA de uma via mostra que a administração intra-SCPD de noradrenalina nas doses de 30, 60 ou 90 nmols não afetou a atividade locomotora dos animais se comparada com o grupo salina [ $F_{(3,40)} = 0,996$ ;  $p > 0,05$ ].



**Figura 6** – Efeito da injeção intra-SCPD de noradrenalina (NA) nas doses de 30 (n=11), 60 (n=10) e 90 nmols (n=11) ou salina (n=11) sobre a latência (s) para a primeira entrada no compartimento escuro no modelo de transição claro-escuro. Os valores foram expressos pela média ± EPM (ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey).



**Figura 7** - Efeito da injeção intra-SCPD de noradrenalina (NA) nas doses de 30 (n=11), 60 (n=10) e 90 nmols (n=11) ou salina (n=11) sobre o tempo de permanência no compartimento claro no modelo de transição claro-escuro. Os valores foram expressos pela média  $\pm$  EPM (ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey). \*  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,01$  comparado ao grupo salina.



**Figura 8** - Efeito da injeção intra-SCPD de noradrenalina (NA) nas doses de 30 (n=11), 60 (n=10) e 90 nmols (n=11) ou salina (n=11) sobre o número de transições entre os dois compartimentos no modelo de transição claro-escuro. Os valores foram expressos pela média  $\pm$  EPM (ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey). \*  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,01$  comparado ao grupo salina.



**Tabela 3-** Efeito da administração intra-SCPD de salina ou noradrenalina nas doses de 30, 60 ou 90 nmols sobre o número de cruzamentos no campo aberto

TRATAMENTO	Nº DE CRUZAMENTOS <sup>a</sup>
Salina	49,9 ± 10,0
NA 30 nmols	54,7 ± 8,4
NA 60 nmols	62,5 ± 4,2
NA 90 nmols	46,3 ± 3,7

<sup>a</sup> Dados representados pela média ± EPM

#### **4.2. Experimento 2: Efeito do pré-tratamento intra-SCPD com propranolol (antagonista não seletivo de receptores beta-adrenérgicos) sobre a administração intra-SCPD de noradrenalina em ratos submetidos ao modelo de transição claro-escuro**

As figuras 9, 10 e 11 mostram o efeito do pré-tratamento com propranolol (10 nmols) sobre a injeção de noradrenalina (30 nmols) nas medidas da latência para a primeira entrada, no tempo de permanência no compartimento claro e no número de transições, respectivamente, no modelo de transição claro-escuro.

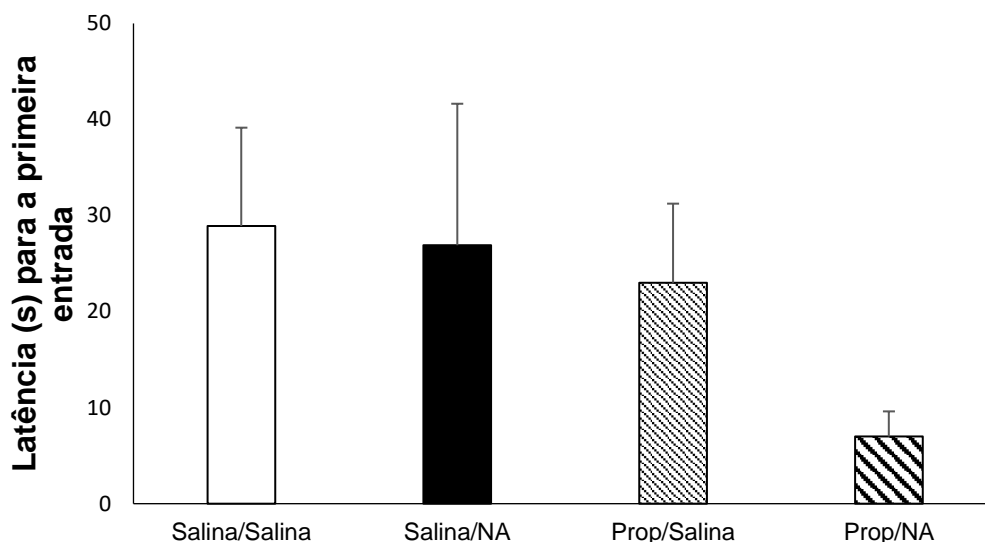
Como pode ser observado na figura 9, a ANOVA de uma via não mostrou efeito significativo do tratamento na latência para a primeira entrada no compartimento escuro [ $F_{(3,44)} = 1,078$ ;  $p = 0,369$ ].

A ANOVA de uma via mostrou que o tratamento com noradrenalina apresentou aumento significativo no tempo de permanência no compartimento claro [ $F_{(3,44)} = 2,872$ ;  $p = 0,028$ ] (figura 10). O pré-tratamento, per se, com o propranolol não alterou o tempo de permanência dos animais no compartimento claro ( $p > 0,05$ ) quando comparado ao grupo salina/salina. No entanto foi capaz de atenuar o efeito do tipo ansiolítico da noradrenalina, pois não houve diferença estatística entre o grupo salina/salina e o grupo propranolol/NA ( $p > 0,05$ ). Porém, não houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo salina/NA e propranolol/NA ( $p > 0,05$ ).

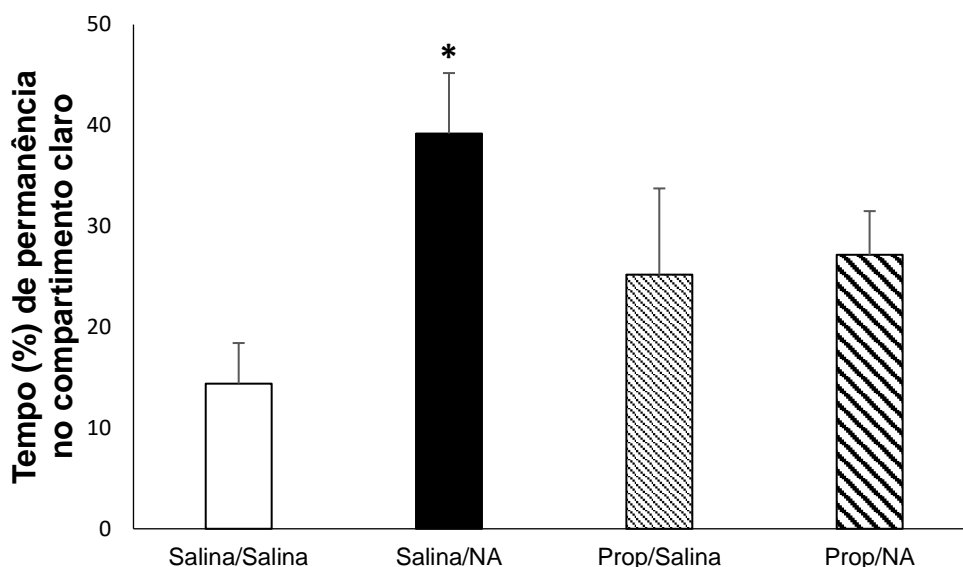
A ANOVA mostrou também que o tratamento com noradrenalina apresentou aumento significativo no número de transições entre os compartimentos claro e escuro [ $F_{(3,44)} = 4,485$ ;  $p = 0,030$ ], como ilustrado na figura 10. Além disso, o tratamento

propranolol/noradrenalina aumentou significativamente o número de transições entre os compartimentos claro e escuro [ $F_{(3,44)} = 4,485$ ;  $p = 0,017$ ].

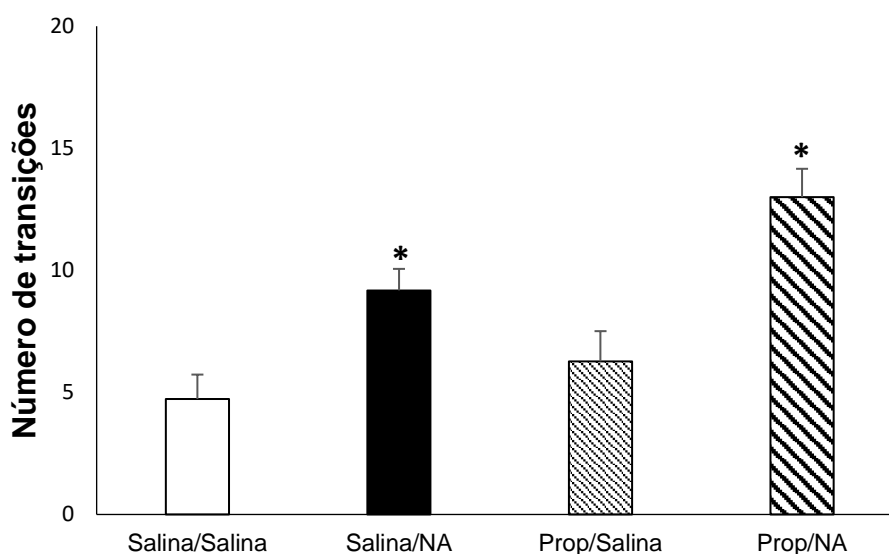
A tabela 4 mostra que a atividade locomotora dos animais no campo aberto não foi alterada pelos tratamentos utilizados [ $F_{(3,44)} = 1,595$ ;  $p > 0,05$ ].



**Figura 9** - Efeito da injeção intra-SCPD de propranolol (Prop; 10 nmols) ou salina 10 minutos antes da injeção intra-SCPD de noradrenalina (NA; 30 nmols) ou salina sobre a latência (s) para a primeira entrada no compartimento escuro no modelo de transição claro-escuro. Grupos: Salina/Salina ( $n = 11$ ), Salina/NA ( $n = 11$ ), Propranolol/Salina ( $n = 11$ ) e Propranolol/NA ( $n = 12$ ). Os valores foram expressos pela média  $\pm$  EPM (ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey).



**Figura 10** - Efeito da injeção intra-SCPD de propranolol (Prop; 10 nmols) ou salina 10 minutos antes da injeção intra-SCPD de noradrenalina (NA; 30 nmols) ou salina sobre o tempo de permanência no compartimento claro no modelo de transição claro-escuro. Grupos: Salina/Salina ( $n = 11$ ), Salina/NA ( $n = 11$ ), Propranolol/Salina ( $n = 11$ ) e Propranolol/NA ( $n = 12$ ). Os valores foram expressos pela média  $\pm$  EPM (ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey). \*  $p < 0,05$  comparado ao grupo Salina/Salina.



**Figura 11** - Efeito da injeção intra-SCPD de propranolol (Prop; 10 nmols) ou salina 10 minutos antes da injeção intra-SCPD de noradrenalina (NA; 30 nmols) ou salina sobre o número de transições entre os dois compartimentos no modelo de transição claro-escuro. Grupos: Salina/Salina (n= 11), Salina/NA (n= 11), Propranolol/Salina (n= 11) e Propranolol/NA (n= 12). Os valores foram expressos pela média  $\pm$  EPM (ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey). \*  $p < 0,05$  comparado ao grupo Salina/Salina.

**Tabela 4-** Efeito da administração prévia intra-SCPD de propranolol ou salina sobre o número de cruzamentos no campo aberto de animais que receberam injeção intra-SCPD de noradrenalina ou salina

TRATAMENTO	Nº DE CRUZAMENTOS <sup>a</sup>
Salina/salina	51,0 $\pm$ 6,0
Salina/NA	51,9 $\pm$ 5,8
Propranolol/salina	45,4 $\pm$ 5,4
Propranolol/NA	62,7 $\pm$ 5,9

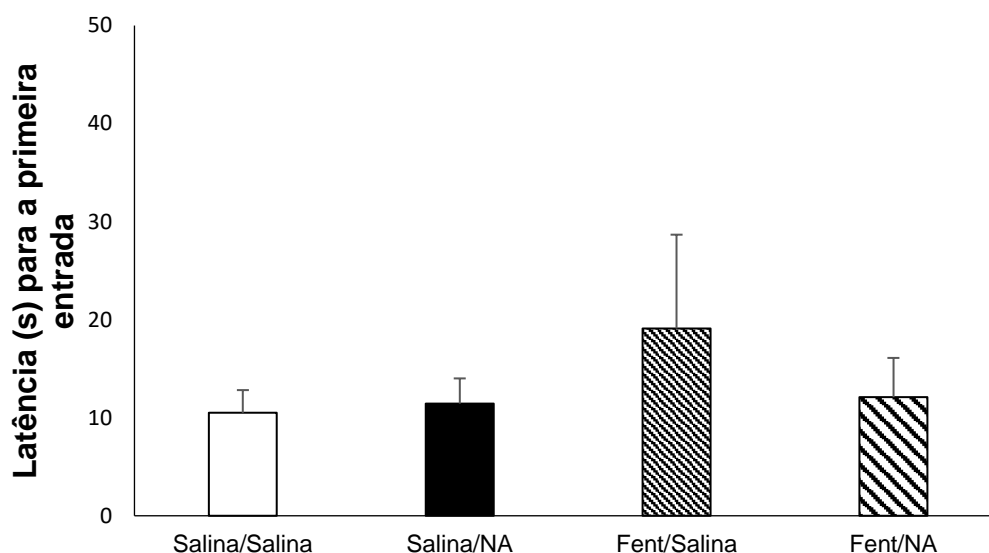
<sup>a</sup> Dados representados pela média  $\pm$  EPM

### 4.3. Experimento 3: Efeito do pré-tratamento intra-SCPD com fentolamina (antagonista não seletivo de receptores alfa-adrenérgicos) sobre a administração intra-SCPD de noradrenalina em ratos submetidos ao modelo de transição claro-escuro

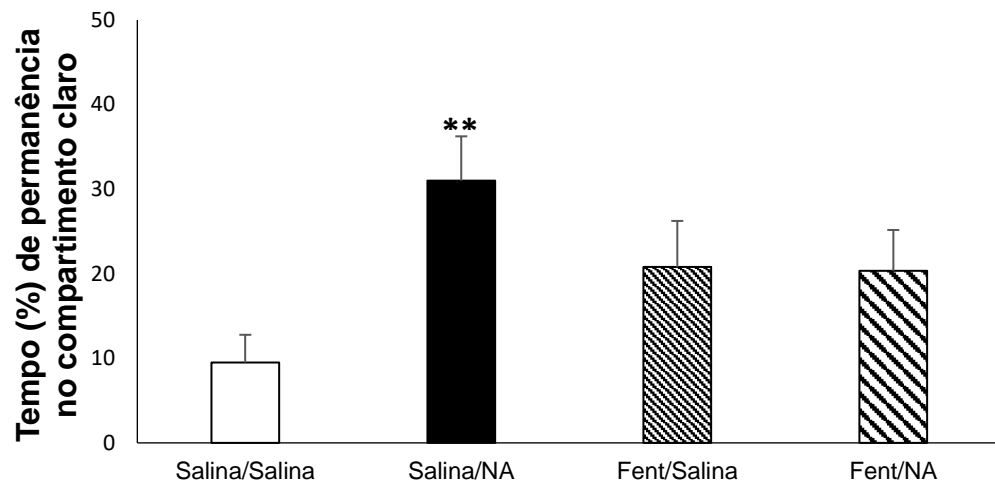
As figuras 12, 13 e 14 mostram o efeito do pré-tratamento com fentolamina (10 nmols) sobre a injeção de noradrenalina (30 nmols) nas medidas da latência para a primeira entrada, no tempo de permanência no compartimento claro e no número de transições, respectivamente, no modelo de transição claro-escuro.

A ANOVA de uma via não mostrou um efeito significativo do tratamento na latência para a primeira entrada [ $F_{(3,38)} = 0,646$ ;  $p = 0,591$ ]. Por outro lado, revelou aumento significativo no número de transições entre os compartimentos claro e escuro nos tratamentos salina/noradrenalina [ $F_{(3,38)} = 6,601$ ;  $p = 0,001$ ], fentolamina/salina [ $F_{(3,38)} = 6,601$ ;  $p = 0,018$ ] e fentolamina/noradrenalina [ $F_{(3,38)} = 6,601$ ;  $p = 0,043$ ]. O tratamento salina/noradrenalina também aumentou o tempo de permanência no compartimento claro [ $F_{(3,38)} = 3,893$ ;  $p = 0,009$ ].

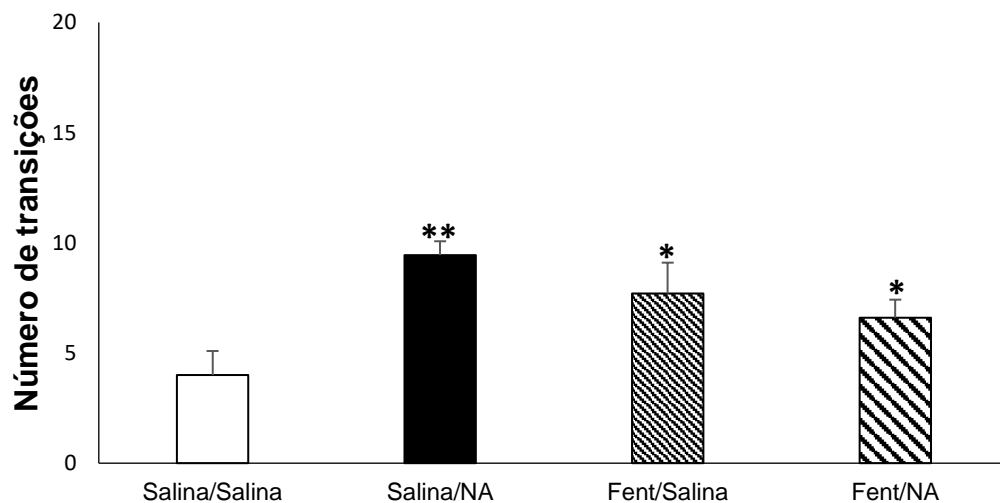
A tabela 4 mostra que a atividade locomotora dos animais no campo aberto não foi alterada pelos tratamentos utilizados [ $F_{(3,38)} = 2,625$ ;  $p > 0,05$ ].



**Figura 12-** Efeito da injeção intra-SCPD de fentolamina (Fent; 10 nmols) ou salina 10 minutos antes da injeção intra-SCPD de noradrenalina (NA; 30 nmols) ou salina sobre a latência (s) para a primeira entrada no compartimento escuro no modelo de transição claro-escuro. Grupos: Salina/Salina ( $n = 10$ ), Salina/NA ( $n = 9$ ), Fentolamina/Salina ( $n = 10$ ) e Fentolamina/NA ( $n = 10$ ). Os valores foram expressos pela média  $\pm$  EPM (ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey).



**Figura 13** - Efeito da injeção intra-SCPD de fentolamina (Fent; 10 nmols) ou salina 10 minutos antes da injeção intra-SCPD de noradrenalina (NA; 30 nmols) ou salina sobre o tempo de permanência no compartimento claro no modelo de transição claro-escuro. Grupos: Salina/Salina (n= 10), Salina/NA (n= 9), Fentolamina/Salina (n= 10) e Fentolamina/NA (n= 10). Os valores foram expressos pela média  $\pm$  EPM (ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey). \*\*  $p < 0,01$  comparado ao grupo Salina/Salina.



**Figura 14** – Efeito da injeção intra-SCPD de fentolamina (Fent; 10 nmols) ou salina 10 minutos antes da injeção intra-SCPD de noradrenalina (NA; 30 nmols) ou salina sobre o número de transições entre os dois compartimentos no modelo de transição claro-escuro. Grupos: Salina/Salina (n= 10), Salina/NA (n= 9), Fentolamina/Salina (n= 10) e Fentolamina/NA (n= 10). Os valores foram expressos pela média  $\pm$  EPM (ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey). \*  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,01$  comparado ao grupo Salina/Salina.

**Tabela 5-** Efeito da administração prévia intra-SCPD de fentolamina ou salina sobre o número de cruzamentos no campo aberto de animais que receberam injeção intra-SCPD de noradrenalina ou salina

<b>TRATAMENTO</b>	<b>Nº DE CRUZAMENTOS<sup>a</sup></b>
Salina/salina	43,3 ± 4,8
Salina/NA	55,0 ± 2,8
Fentolamina/salina	50,1 ± 4,6
Fentolamina/NA	41,0 ± 3,1

<sup>a</sup> Dados representados como média ± EPM

## 5. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

No presente trabalho, foi testada a hipótese de que a noradrenalina administrada diretamente na SCPD teria um efeito do tipo ansiolítico em animais submetidos ao modelo de transição claro-escuro. Para tanto, inicialmente foi investigada se a administração intra-SCPD de noradrenalina nas doses de 30, 60 e 90 nmols (experimento 1) teria efeito sobre as respostas comportamentais no modelo.

Os parâmetros utilizados incluem a latência para a primeira entrada no compartimento escuro, o número de transições entre os compartimentos e o tempo de permanência no compartimento claro. O tempo gasto em cada compartimento tem sido referido como um reflexo de aversão (BELZUNG et al., 1987) e o número de transições como um índice da atividade exploratória (CRAWLEY; GOODWIN, 1980; COSTALL et al., 1989a, 1989b). Já a latência para a primeira entrada no compartimento escuro está envolvida com a inibição do animal (HASCOËT; BOURIN, 1998).

Os resultados obtidos no presente estudo mostram que as drogas utilizadas não alteraram a atividade locomotora dos animais medida no teste do campo aberto. Isto indica que os efeitos observados no modelo de transição claro-escuro não sejam devidos à ação inespecífica das drogas empregadas sobre a atividade locomotora dos animais.

Em relação à latência para a primeira entrada no compartimento escuro, nossos resultados não mostraram efeito significativo dos tratamentos utilizados em nenhum dos experimentos. Da mesma maneira, Grivas e colaboradores (2013) não encontraram efeitos significantes neste parâmetro ao administrarem sistemicamente o LY379268, um agonista seletivo para os receptores do Grupo II de mGlu<sub>2/3</sub>. Porém, efeito do tipo ansiogênico foi encontrado na análise do tempo de permanência no compartimento claro e no número de transições.

Em contrapartida, alguns trabalhos mostram efeitos significantes na latência para a primeira entrada no compartimento escuro. Assim, Young e Johnson (1991) administraram sistemicamente o agonista de receptor de 5-HT<sub>1A</sub> (8-OH-DPAT), o antidepressivo imipramina, o neuroléptico clorpromazina e o estimulante do sistema nervoso central, anfetamina. A imipramina na dose de 3,16 mg/kg e a clorpromazina nas doses de 1 e 3,16 mg/kg aumentaram a latência para a primeira entrada no

compartimento escuro, acompanhados de hipolocomoção na análise da atividade locomotora. Já o 8-OH-DPAT também aumentou significativamente a latência para a primeira entrada no compartimento escuro em doses entre 0,001 e 3,16 mg/kg sem alteração na atividade locomotora.

Apesar dos dados disponíveis na literatura sobre o tempo de latência para a primeira entrada, este parâmetro é pouco discutido pelos autores. No entanto, existem duas hipóteses que são discutidas. A primeira é que o aumento do tempo de latência pode ser o resultado de um comportamento desinibido e diminuição da ansiedade, onde os animais passam mais tempo explorando o compartimento claro. A outra explicação é a influência da sedação, onde os animais apresentam dificuldade em se locomover rapidamente para o compartimento escuro (COSTALL, 1990a). Este parâmetro não foi usado pelos criadores do modelo Crawley e Goodwin (1980), em contraste com alguns outros autores (COSTALL et al., 1988a, 1988b, 1990a, 1990b, 1993; GRIVAS et al., 2013).

Em relação aos resultados do experimento 1 do presente estudo, a noradrenalina nas doses de 30 e 60 nmols, administrada na SCPD, aumentou o tempo de permanência no compartimento claro e o número de transições dos animais submetidos ao teste de transição claro-escuro, sugerindo um efeito do tipo ansiolítico.

Corroborando estes resultados, estudos prévios realizados por Pelosi e colaboradores (2009) mostraram que a injeção de noradrenalina diretamente na SCPD induz efeito do tipo ansiolítico em dois modelos animais de conflito. Assim, foi mostrado que a administração intra-SCPD de noradrenalina aumentou tanto o número de entradas quanto o tempo de permanência nos braços abertos em animais submetidos ao LCE. Além disso, a administração intra-SCPD de noradrenalina aumentou o número de lambidas punidas em comparação ao grupo controle no teste de conflito de Vogel, indicando efeito do tipo ansiolítico.

Ademais, dados não publicados do nosso laboratório (CARVALHO, 2016) e estudo recentemente descrito por Estrada e colaboradores (2016) reforçam o efeito do tipo ansiolítico da noradrenalina na SCPD. Ambos trabalhos mostram que a administração intra-SCPD de noradrenalina em animais testados no labirinto em T elevado prejudicou a aquisição da esQUIVA inibitória dos braços abertos, sugerindo também um efeito do tipo ansiolítico.



No entanto, nos dois estudos não foram observadas alterações na resposta de fuga dos animais que receberam administração intra-SCPD de noradrenalina em comparação ao grupo controle. Assim, estes resultados indicam que o sistema noradrenérgico da SCPD não participa da resposta de fuga no LTE, sugerindo que outros sistemas de neurotransmissores atuem modulando esta resposta neste modelo animal.

Em seguida, com o objetivo de verificar a participação dos receptores noradrenérgicos envolvidos no efeito do tipo ansiolítico da noradrenalina encontrado neste estudo, realizamos um pré-tratamento intra-SCPD com os antagonistas não seletivos de receptores beta-adrenérgicos propranolol e alfa-adrenérgicos fentolamina, nos experimentos 2 e 3, respectivamente.

Nossos resultados mostram que o pré-tratamento com o propranolol (experimento 2) em uma dose que por si só não apresentou efeito, foi capaz de atenuar o efeito do tipo ansiolítico da noradrenalina quando analisado o tempo de permanência dos animais no compartimento claro, visto que, não houve diferença estatística entre os grupos salina/NA e propranolol/NA.

Entretanto, no parâmetro número de transições entre os compartimentos claro e escuro, o propranolol não foi capaz de atenuar o efeito do tipo ansiolítico da noradrenalina. Estes resultados não são claros e ao nosso conhecimento não foram encontrados na literatura trabalhos utilizando o modelo de transição claro-escuro, onde um efeito na porcentagem de tempo no compartimento claro não se generalize sobre o número de transições.

A participação de receptores beta-adrenérgicos no efeito do tipo ansiolítico foi observada em estudos anteriores, onde animais que receberam cocaína por sete dias e após 24h da retirada da droga foram tratados com propranolol, aumentando o número de entradas e a porcentagem de tempo nos braços abertos, no LCE. Ao contrário do encontrado em nosso estudo, o propranolol foi capaz de bloquear o efeito do tipo ansiogênico causado pela abstinência da cocaína.

Por fim, nossos resultados mostram que o pré-tratamento com a fentolamina (experimento 3) em uma dose que por si só não apresentou efeito, foi capaz de atenuar o efeito da noradrenalina quando analisado o tempo de permanência no compartimento claro, visto que não houve diferença estatística entre os grupos salina/NA e fentolamina/NA.

Assim como o propranolol, a fentolamina não foi capaz de atenuar o efeito do tipo ansiolítico da noradrenalina no número de transições entre os compartimentos claro e escuro.

Além disso, curiosamente nossos resultados mostraram um efeito significativo no grupo fentolamina/salina quando comparado ao grupo salina/salina, ou seja, a fentolamina na dose utilizada induziu aumento no número de transições, sugerindo efeito do tipo ansiolítico. Este efeito também não é claro, mas como trata-se de um antagonista alfa-adrenérgico não-seletivo, é possível que a fentolamina tenha bloqueado mais receptores alfa2-adrenérgicos pré-sinápticos, aumentando assim os níveis de noradrenalina. É interessante destacar que a ativação de receptores alfa-2 pré-sinápticos promove inibição da liberação de noradrenalina (STARKE, 2001).

Neste sentido, La Marca e Dunn (1994) mostraram que a administração sistêmica de antagonistas alfa2-adrenérgicos idazoxano e rauwolscina, mas não ioimbina ou piperoxano, aumentou significativamente a resposta de desinibição no teste de Vogel. O efeito do tipo ansiolítico do idazoxano e rauwolscina pode ser devido à maior seletividade desses agentes para receptores alfa-2 do que para alfa-1, bem como a sua maior afinidade para os receptores pré-sinápticos alfa 2 (BOYAJIAN; LESLIE, 1984; BYLUND, 1985).

De forma semelhante, Hott e colaboradores (2012) observaram uma participação dos dois tipos de receptores, alfa e beta-adrenérgicos, na expressão do medo condicionado contextual, visto que, a administração intra-NLET de fentolamina e propranolol reduziram o *freezing* e as respostas autonômicas eliciadas pelo modelo animal utilizado.

Baseado nos resultados encontrados em nosso estudo pode-se observar também o papel modulatório da SCPD nos comportamentos defensivos relacionados com o transtorno de ansiedade generalizada (TAG). Conforme McNaughton e Cor (2004) e Graeff e Guimarães (2012) a SCPD, assim como a amígdala, o córtex pré-frontal e a porção medial do hipotálamo, participa tanto da resposta de fuga (relacionando-se com o TP) quanto da esquiva inibitória (relacionando-se com TAG). Essas estruturas encefálicas participam em todos os níveis de ameaça, porém organizadas numa hierarquia funcional, com maior atuação das estruturas rostrais em ameaças potenciais e de estruturas caudais nas respostas de luta e fuga.

Em conjunto, os resultados do presente trabalho são compatíveis com a proposta de envolvimento da neurotransmissão noradrenérgica na SCPD, via receptores alfa e

beta-adrenérgicos, em reações defensivas associadas com o transtorno de ansiedade generalizada em animais submetidos ao modelo de transição claro-escuro. Estes resultados fortalecem outros estudos relacionados à participação da noradrenalina na ansiedade. No entanto, outros estudos são necessários para uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos no efeito do tipo ansiolítico da noradrenalina, visando determinar quais subtipos de receptores adrenérgicos estão mediando a ação desse neurotransmissor na SCPD no modelo de transição claro-escuro.

## 6. CONCLUSÃO

- Noradrenalina nas doses de 30 e 60 nmols aumentaram o tempo de permanência no compartimento claro e o número de transições entre os compartimentos claro e escuro, sugerindo efeito do tipo ansiolítico.
- Propranolol foi capaz de atenuar os efeitos ansiolíticos da noradrenalina quando analisado o tempo de permanência no compartimento claro.
- Fentolamina foi capaz de atenuar os efeitos ansiolíticos da noradrenalina quando analisado o tempo de permanência no compartimento claro.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, F. H. F.; RESSEL, L. B. M.; CORREA, F. M. A.; CRESTANI, C. C. Bed nucleus of the stria terminalis  $\alpha$ 1- and  $\alpha$ 2-adrenoceptors differentially modulate the cardiovascular responses to exercise in rats. **Neuroscience.**, v. 177, p. 74-83, 2011.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais**. Tradução por NASCIMENTO et al., 5 ed., Porto Alegre: Artmed, 2014.

BANDLER, R.; CARRIVE, P.; DEPAULIS, A. Introduction: Emerging principles of organization of the midbrain periaqueductal gray matter. In: DEPAULIS, A.; BANDLER, R. **The midbrain periaqueductal gray matter: functional, anatomical and neurochemical organization**. New York: Plenum Press, p. 1-8, 1991.

BANDLER, R.; SHIPLEY, M. T. Columnar organization in the midbrain periaqueductal gray: modules for emotional expression? **Neurosciences**, v. 17, p. 379-389, 1994.

BANDLER, R.; KEAY, K. A.; FLOYD, N.; PRICE, J. Central circuits mediating patterned autonomic activity during active vs. passive emotional coping. **Brain Res. Bull.**, v. 53, p. 95-104, 2000.

BEHBEHANI, M. M. Functional characteristics of the midbrain periaqueductal gray. **Prog. Neurobiol.**, v. 46 (6), p. 575-605, 1995.

BEIJAMINI, V.; GUIMARÃES, F. S. Activation of neurons containing the enzyme nitric oxide synthase following exposure to an elevated plus maze. **Brain Res. Bull.**, v. 69, p. 347-355, 2006.

BEITZ, A. J.; CLEMENTS, J. R.; MULLET, M. A.; ECKLUND, L. L. Differential origin of brainstem serotonergic projections to the midbrain periaqueductal gray and superior colliculus of the rat. **J. Comp. Neurol.**, v. 250, p. 498-509, 1986.

BEITZ, A. J. Central gray. In: PAXINOS, G. **The human nervous system**. San Diego: Academic Press, p. 307-320, 1990.

BEITZ, A. J. Periaqueductal gray. In: PAXINOS, G. **The rat nervous system**. 2 ed., San Diego: Academic Press, p. 173-182, 1995.

BELZUNG, C.; MISSLIN, R.; VOGEL, E.; DODD, R. H.; CHAPOUTHIER, G. Anxiogenic effects of methyl- $\beta$ -carboline-carboxylate in a light/dark choice situation. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 28, p. 29-33, 1987.

BLANCHARD, R. J.; BLANCHARD, D. C. Attack and defense in rodents as ethoexperimental models for the study of emotion. **Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiat.**, Great Britain, v. 13, p. 03-14, 1989.

BLANCHARD, R. J.; YUDKO E. B.; RODGERS, R. J.; BLANCHARD, D. C. Defense system psychopharmacology: an ethological approach to the pharmacology of fear and anxiety. **Behav Brain Res.**, v. 58 (1-2), p. 155-165, 1993.

BLANCHARD, D. C. Stimulus and environmental control of defensive behaviors. In: BOUTON, M.; FANSELOW, M. The Functional Behaviorism of Robert C. Bolles: Learning, Motivation and Cognition. Washington, D.C: **American Psychological Association**, p. 283-305, 1997.

BRANDÃO, M. L.; CARDOSO, S. H.; MELO, L. L.; MOTTA, V.; COIMBRA, N. C. Neural substrate of defensive behavior in the midbrain tectum. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 18 (3), p. 339-346, 1994.

BRANDÃO, M. L. Comportamento emocional. In: BRANDÃO, M. L. **Psicofarmacologia: As bases fisiológicas do comportamento**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, p. 146, 2001.

BRANDÃO, M. L.; TRONCOSO, A. C.; SILVA, M. A. S.; HUSTON, J. P. The relevance of neuronal substrates of defense in the midbrain tectum to anxiety and stress: empirical and conceptual considerations. **European Journal of Pharmacology**, v. 463, p. 225-233, 2003.

BRANDÃO, M. L.; ZANOVELI, J. M.; RUIZ-MARTINEZ, R. C.; OLIVEIRA, L. C.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J. Different patterns of freezing behavior organized in the periaqueductal gray of rats: association with different types of anxiety. **Behav. Brain Res.**, v. 188, p. 1-13, 2008.

BRUNELLO, N.; BLIER, P.; JUDD, L. L.; MENDLEWICZ, J.; NELSON, C. J.; SOUERY, D. Noradrenaline in mood and anxiety disorders: basic and clinical studies. **Int. Clin. Psychopharmacol.**, v. 18, p. 191-202, 2003.

BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. **As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman**. Tradução por LANGELOH et al., 12 ed., Porto Alegre: AMGH, p.194, 2012.

CAMERON, A. A.; KHAN, I. A.; WESTLUND, K. N.; WILLIS, W. D. The efferent projections of the periaqueductal gray in the rat: a Phaseolus vulgaris leucoagglutinin study: Descending projections. **J. Comp. Neurol.**, v. 351 (4), p. 585-601, 1995.

CAMPLESI JR., M.; DE BORTOLI, V. C.; SOARES, V.; NOGUEIRA, R. L.; ZANGROSSI JR, H. Dorsal periaqueductal gray stimulation facilitates anxiety-, but not panic-related, defensive responses in rats tested in the elevated T-maze. **Brazilian J. of Medical and Biol. Research**, v. 45 (11), p. 1025-1030, 2012.

CARRIVE, P. The periaqueductal gray and defensive behavior: functional representation and neuronal organization. **Behav. Brain Res.**, v. 58(1-2), p. 27-47, 1993.

CARVALHO, J. Jr. V. Papel da neurotransmissão noradrenérgica da substância cinzenta periaquedutal dorsal na modulação de comportamentos defensivos relacionados aos transtornos de ansiedade generalizada e pânico. Vitória. Dissertação de mestrado. **UFES**, 2016.

CECCHI, M.; KHOSHBOUEI, H.; MORILAK, D. A. Modulatory effects of norepinephrine, acting on  $\alpha_1$  receptors in the central nucleus of the amygdala, on behavioral and neuroendocrine responses to acute immobilization stress. **Neuropharmacology**, v. 43, p. 1139-1147, 2002a.

CECCHI, M.; KHOSHBOUEI, H.; JAVORS, M.; MORILAK, D. A. Modulatory effects of norepinephrine in the lateral bed nucleus of the stria terminalis on behavioral and neuroendocrine responses to acute stress. **Neuroscience**, v. 112, p. 13-21, 2002b.

CHAULOFF, R.; DURANT, M; MORMÉDE, D. Anxiety and activity- related effects of two diazepam and chlordiazepoxide in the rat light-dark and dark-light test. **Behav. Brain. Res.**, v. 85, p. 27-35, 1997.

CITÓ, M. C. O.; DA SILVA, F. C. C.; SILVA, M. I. G.; MOURA, B. A.; MACÊDO, D. S.; WOODSB, D. J.; FONTELES, M. M. F.; VASCONCELOS, S. M. M.; DE SOUSA, F. C.

F. Reversal of cocaine withdrawal-induced anxiety by ondansetron, buspirone and propranolol. **Behavioural Brain Research**, v. 231, p. 116-123, 2012.

COLLINS, S.; SURWIT, R. S. The beta-adrenergic receptors and the control of adipose tissue metabolism and thermogenesis. **Recent. Prog. Horm. Res.**, v. 56, p. 309-328, 2005.

COSTALL, B.; KELLY, M. E.; NAYLOR, R. J.; ONAIVI, E. S. Actions of buspirone in a putative model of anxiety in the mouse. **J. Pharm. Pharmacol.** v. 40, p. 494-500, 1988a.

COSTALL, B.; DOMENEY, A. M.; GERRARD, P. A.; KELLY, M. E.; NAYLOR, R. J. Effects of the 5-HT receptors antagonist GR38032F, ICS 205930 and BRL 43694 in tests for anxiolytic activity. **Br. J. Pharmacol**, v. 93, p. 195, 1988b.

COSTALL, B.; KELLY, M. E.; NAYLOR, R. J.; ONAIVI, E. S. The actions of nicotine and cocaine in a mouse model of anxiety. **Pharmac. Biochem. Behav.**, v. 33 (1 ), p. 197-203, 1989a.

COSTALL, B.; JONES, B. J.; KELLY, M. E.; NAYLOR, R. J.; TOMKINS, D. M. Exploration of mice in a black and white test box: Validation as a model of anxiety. **Pharmac. Biochem. Behav.**, v. 32 (3), p. 777-785, 1989b.

COSTALL, B.; DOMENEY, A. M.; GERRARD, P. A.; HOROVITZ, Z. P.; KELLY, M. E.; NAYLOR, R. J.; TOMKINS, D. M. Effects of captopril and SQ29,852 on anxiety-related behaviours in the rodent and marmoset. **Pharmac. Biochem. Behav.**, v. 36 (1), p. 13-20, 1990a.

COSTALL, B.; JONES, B. J.; KELLY, M. E.; NAYLOR, R. J.; ONAIVI, E. S.; TYERS, M. B. Sites of action of ondansetron to inhibit withdrawal from drugs of abuse. **Pharmac. Biochem. Behav.**, v. 36 (1), p. 97-104, 1990b.

COSTALL, B.; DOMENEY, A. M.; KELLY, M. E.; TOMKINS, D. M.; NAYLOR, R. J.; WONG, E. H. F.; SMITH, W. L.; WHITING, R. L.; EGLEN, R. M. The effect of the 5-HT<sub>3</sub> receptor antagonist, RS-42358-197, in animal models of anxiety. **European Journal of Pharmacology**, v. 234, p. 91-99, 1993.



CRAWLEY, J.; GOODWIN, F. K. Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. **Pharmac. Biochem. Behav.**, v. 13 (2), p. 167-170, 1980.

CRESTANI, C. C.; ALVES, F. H. F.; CORRÊA, F. M. A. Both  $\alpha 1$  and  $\alpha 2$ -adrenoceptors mediate the cardiovascular responses to noradrenaline microinjected into the bed nucleus of the stria terminal of rats. **British journal of pharmacology.**, v. 153, p. 583-590, 2008.

DARWIN, C. R. **The expression of the emotions in man and animals**. 1. ed. London: John Murray, 1872.

DAVIS, M.; WALKER, D. L.; LEE, Y. Roles of the amygdala and bed nucleus of the stria terminalis in fear and anxiety measured with the acoustic startle reflex. **Annals New York Academy of Sciences**, v. 821, p. 305-331, 1997.

DE ANGELIS, L. Experimental anxiety and antidepressant drugs: the effects of moclobemide, a selective reversible MAO-A inhibitor, fluoxetine and imipramine in mice. **Naun. Schmied. Arch. Pharmacol.** v. 354, p. 379-383, 1996.

DE OLIVEIRA, R. W.; DEL BEL, E. A.; GUIMARÃES, F. S. Behavioral and c-fos expression changes induced by nitric oxide donors microinjected into the dorsal periaqueductal gray. **Brain Res. Bull.**, v. 51 (6), p. 457-464, 2000.

DE SOUZA, M. M.; SCHENBERG, L. C.; CAROBREZ, A. C. NMDA-coupled periaqueductal gray glycine receptors modulate anxiolytic drug effects on plus-maze performance. **Behav. Brain Res.**, v. 90 (2), p. 157-165, 1998.

ESTRADA, V. B.; MATSUBARA, N. K; GOMES, M. V.; CORREA, F. M. A.; PELOSI, G. G. Noradrenaline microinjected into the dorsal periaqueductal gray matter causes anxiolytic-like effects in rats tested in the elevated T-maze. **Life sciences**. v.152, p. 94-98, 2016.

ETKIN, A. Neurobiology of anxiety: From neural circuits to novel solutions? **Depression and anxiety**, v. 29, p. 355-358, 2012.

FERREIRA-NETTO, C.; BORELLI, K. G.; BRANDÃO M. L. Neural segregation of Fos-protein distribution in the brain following freezing and escape behaviors induced by

injections of either glutamate or NMDA into the dorsal periaqueductal gray of rats. **Brain Res.**, v. 1031 (2), p. 151-163, 2005.

FITZGERALD, P. A. Adrenal medulla & paraganglia. In: GARDNER, D. G.; SHOBACK, D. **Greenspan's Basic & Clinical Endocrinology**. San Francisco: The McGraw-Hill Companies, p. 429-432, 2007.

FUXE, K. Evidence for the existence of monoamine neurons in the central nervous system. IV. Distribution of monoamine nerve terminals in the central nervous system. **Acta Physiol. Scand. Suppl.**, v. 247, p. 39-85, 1965.

GAO, B.; CUTLER, M. G. Effect of acute administration of the 5-HT<sub>3</sub> receptor antagonist, BRL 46470A, on the behavior of mice in a two compartment light-dark box and during social interactions in their home cage and unfamiliar neutral cage. **Neuropharmacology**, v. 31, p. 743-748, 1992.

GOMES, J. M. Papel das porções dorsal e ventrolateral da matéria cinzenta periaqueductal de camundongos na modulação das reações comportamentais defensivas e antinocicepção induzidas por situações aversivas. Ribeirão Preto. Tese de doutorado. **USP**, 2010.

GRAEFF, F.G. Brain defense systems and anxiety. In: BURROWS, G.D.; ROTH, M.; NOYES JR., R. **Handbook of Anxiety: The Neurobiology of Anxiety**. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, v. 3, p. 307-354, 1990.

GRAEFF, F. G.; SILVEIRA, M. C.; NOGUEIRA, R. L; AUDI, E. A.; OLIVEIRA, R. M. Role of the amygdala and periaqueductal gray in anxiety and panic. **Behav. Brain Res.**, v. 58 (1-2), p. 123-131, 1993.

GRAEFF, F. G.; VIANA, M. B.; TOMAZ, C. The elevated T-maze, a new experimental model of anxiety and memory: effect of diazepam, **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 26, p. 67-70, 1993.

GRAEFF, F.G. Neuroanatomy and neurotransmitter regulation of defensive behaviors and related emotions in mammals. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 27(4), p.11-29, 1994.

GRAEFF, F.G.; VIANA, M.B.; MORA, P.O. Dual role of 5-HT in defense and anxiety. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 21 (6), p. 791-799, 1997.

GRAEFF, F. G., NETTO, C. F., ZANGROSSI, H. Jr. The elevated T-maze as an experimental model of anxiety. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 23, p. 237–246, 1998.

GRAEFF, F. G.; BRANDÃO, M. L. **Neurobiologia das doenças mentais**. 4 ed. São Paulo: Editora Lemos, 1999.

GRAEFF, F. G.; GUIMARÃES, F. S. **Fundamentos da psicofarmacologia**. 2 ed. São Paulo: Editora Atheneu, p. 170-171, 2012.

GRAY, J. A.; MCNAUGHTON, N. Anxiolytic action on the behavioral inhibition system implies multiple types of arousal contribute to anxiety. **J. Affect. Disord.**, v. 61 (3), p. 161-176, 2000.

GRIEBEL, G.; PERRAULT, G.; SANGER, D. J. Characterization of the behavioral profile of the non-peptide CRF receptor antagonist CP-154,526 in anxiety models in rodents. Comparison with diazepam and buspirone. **Psychopharmacology**, v. 138 (1), p. 55-66, 1998.

GRIVAS, V.; MARKOU, A.; PITSIKAS, N. The metabotropic glutamate 2/3 receptor agonist LY379268 induces anxiety-like behavior at the highest dose tested in two rat models of anxiety. **European J. of Pharmacology**, v. 715, p. 105-110, 2013.

GUIMARÃES, F. S.; CAROBREZ, A. P.; DE AGUIAR, J. C.; GRAEFF, F. G. Anxiolytic effect in the elevated plus-maze of the NMDA receptor antagonist AP7 microinjected into the dorsal periaqueductal gray. **Psychopharmacology**, v. 103, p. 91-94, 1991.

HALL, C. S. Temperament: A survey of animal studies. **Psychological Bulletin**, v. 38 (10), p. 909–943, 1941.

HANDLEY, S. L.; MITHANI, S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.**, v. 327, p. 1-5, 1984.

HASCÖET, M.; BOURIN, M. A new approach to the light-dark test procedure in mice. **Pharmacol. Biochem. Behav.** v. 60 (3), p. 645-653, 1998.

HENDRIE, C. A.; WEISS, S. M.; EILAM, D. Exploration and predation models of anxiety: evidence from laboratory and wild species. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 54 (1), p. 13-20, 1997.

HETEM, L. A. B.; GRAEFF, F. G. **Transtornos de ansiedade**. 2 ed. São Paulo: Editora Atheneu, p. 74, 2012.

HOTT, S. C.; GOMES, F. V.; FABRI, R. S.; REIS, D. G.; CRESTANI, C. C.; CORREA, F. M. A.; RESSTEL, L. B. M. Both  $\alpha$ 1- and  $\beta$ 1-adrenoceptors in bed nucleus of the stria terminalis are involved in the expression of conditioned contextual fear. **British J. Pharmacol.**, v. 167, p. 207-221, 2012.

HSIAO, J. K.; POTTER, W. Z. Mechanism of action of antipanic drugs. In: BALLENGER, J. C. (Ed). **Clinical aspects of panic disorders**. New York: Wiley-Liss, p. 297-317, 1990.

JIMENEZ, M.; LEGER, B.; CANOLA, K.; LEHER, L.; ARBOIT, P.; SEYDOUX, J.; RUSSEL, A.; GIACOBINO, J. P.; MUZZIN, P.; PREITNER, F.  $\beta$ 1/  $\beta$ 2/  $\beta$ 3-adrenoceptor knockout mice are obese and cold-sensitive but have normal lipolytic responses to fasting. **FEBS Lett**, v. 503 (1-3), p. 37-40, 2002.

JORGE, S. D.; POBBE, R. L. H.; SOARES, V. P.; OLIVEIRA, A. M.; ZANGROSSI, H. JR. Effects os sibutramine on anxiety-related behaviours in rats. **Pharmacol. Research.**, v. 50 (5), p. 517-522, 2004.

KATZUNG, B. G. **Farmacologia Básica e Clínica**. Editora Atheneu, 2007.

KLEIN, D. F.; FINK, M. Psychiatric reaction patterns to imipramine. **Am. J. Psychiatry**, v. 119, p. 432-438, 1962.

KLEIN, D. F. Delineation of two drug-responsive anxiety syndromes. **Psychopharmacology**, v. 53, p. 397-408, 1964.

LAPIZ, M. D.; MATEO, Y.; DURKIN, S.; PARKER, T.; MARSDEN, C. A. Effects of central noradrenaline depletion by the selective neurotoxin DSP-4 on the behaviour of the isolated rat in the elevated plus maze and water maze. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 155, p. 251-259, 2001.

LEWIS, A. apud GENTIL, V.; GENTIL, M. L. F. Os conceitos de ansiedade e angústia em psiquiatria e psicanálise. In: HETEM, L. A. B.; GRAEFF, F. G. **Transtornos de Ansiedade**. 2. ed. São Paulo: Editora Atheneu, p. 29-41, 2012.

LA MARCA, S.; DUNN R. W. The alfa2-antagonists idaxozan and rauwolscine but not yohimbine or piperoxan are anxiolytic in the Vogel lick-shock conflict paradigm following intravenous administration. **Life Sciences**, v. 54, (10), p. 179-184, 1994.

LITVIN, Y.; BLANCHARD, D. C.; BLANCHARD, R. J. Rat 22kHz ultrasonic vocalizations as alarm cries. **Behav. Brain Res.**, v. 182, p. 166-172, 2007.

MANTYH, C. R.; KRUGER, L.; BRECHA, N. C.; MANTYH, P. W. Localization of specific binding sites for atrial natriuretic factor in the central nervous system of rat, guinea pig, cat and human. **Brain research**, v. 412 (2), p. 329-342, 1987.

MCNAUGHTON, N.; MASON, S. T. The neuropsychology and neuropharmacology of the dorsal ascending noradrenergic bundle – a review. **Prog. Neurobiol.**, v. 14, p. 157–219, 1980.

MCNAUGHTON, N.; CORR, P. J. A two-dimensional neuropsychology of defense: fear/anxiety and defensive distance. **Neuroscience and behavioral reviews**, v. 28 (3), p. 285-305, 2004.

MERLO PICH, E.; SAMANIN, R. A two-compartment exploratory model to study anxiolytic/anxiogenic effects of drugs in the rat. **Pharmacol. Res.**, v. 21 (5), p. 595-602, 1989.

MORILAK, D. A.; FRAZER, A. Antidepressants and brain monoaminergic systems: a dimensional approach to understanding their behavioural effects in depression and anxiety disorders. **Int. J. Neuropsychopharmacol.**, v. 7, p. 193-218, 2004.

NADAL-VICENS, M.; CHYUNG, J. H.; TURNER, T. J. Farmacologia da Neurotransmissão Serotoninérgica e Adrenérgica Central. In: GOLAN, D. E. **Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 186-202, 2009.

NEOPHYTOU, S. I.; ASPLEY, S.; BUTLER, S.; BECKETT, S.; MARSDEN, C. A. Effects of lesioning noradrenergic neurones in the locus coeruleus on conditioned and unconditioned aversive behaviour in the rat. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry**, v. 25 (6), p. 1307-1321, 2001.

NETTO, C. F.; GUIMARÃES, F. S. Anxiogenic effect of cholecystokinin in the dorsal periaqueductal gray. **Neuropsychopharmacology**, v. 29 (1), p. 101-107, 2004.

NUTT, D. J.; GEORGE, D. T. Serotonin and anxiety. In: BURROWS, G. D.; ROTH, M.; NOYES, R. JR. **Handbook of anxiety. The Neurobiology of anxiety**. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, v. 3, p. 189-221, 1990.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The Rat Brain: In stereotaxic coordinates**. Londres. 6 ed. Elsevier. 2007.

PELOSI, G. G.; RESSTEL, L. B. M.; SOARES, V. P.; ZANGROSSI, H.; GUIMARÃES, F. S.; CORRÊA, F. M. A. Anxiolytic-like effect of noradrenaline microinjection into the dorsal periaqueductal gray of rats. **Behavioural Pharmacology**, v. 20, p. 252-259, 2009.

POLTRONIERI, S. C.; ZANGROSSI, H. JR.; VIANA, M. B. Antipanic-like effect of serotonin reuptake inhibitors in the elevated T-maze. **Behav. Brain Res.**, v. 147 (1/2), p. 185-192, 2003.

RAUD, S.; INNOS, J.; ABRAMOV, U.; REIMETS, A.; KÕKS, S.; SOOSAAR, A.; MATSUI, T.; VASAR, E. Targeted invalidation of CCK2 receptor gene induces anxiolytic-like action in light–dark exploration, but not in fear conditioning test. **Psychopharmacology**, v. 181, p. 347-357, 2005.

SAAVEDRA, J. M.; KVETNANSKY, R.; KOPIN, I.J. Adrenaline, noradrenaline and dopamine levels in specific brain stem areas of acutely immobilized rats. **Brain Research**, v. 160, p. 271-280, 1979.

SÁNCHEZ, C. 5-HT<sub>1A</sub> receptors play an important role in modulation of behavior of rats in a two-compartment black and white box. **Behav. Pharm.**, v. 7, p. 788-797, 1996.

SÁNCHEZ, C.; MAIER, E. Behavioral profiles of SSRIs in animal models of depression, anxiety and aggression. Are they alike? **Psychopharmacol.** v. 129, p. 197-205, 1997.

SCHENBERG, L. C.; BITTENCOURT, A. S.; SUDRE, E. C.; VARGAS, L. C. Modeling panic attacks. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 25 (7/8), p. 647-659, 2001.

SHIMADA, T.; MATSUMOTO, K.; OSANAI, M.; MATSUDA, H.; TERASAWA, K.; WATANABE, H. The modified light/dark transition test in mice: evaluation of classic and putative anxiolytic and anxiogenic drugs. **Gen. Pharmacol.** v. 26, p. 205-210, 1995.

SCHIMITT, M. L.; COELHO, W.; LOPES-DE-SOUZA, A. S.; CAROBREZ, A. P. Anxiogenic-like effect of glycine and D-serine microinjected into dorsal periaqueductal gray matter of rats. *Neurosci. Lett.*, v. 189 (2), p. 93-96, 1995.

SOARES, V. P.; ZANGROSSI, H. Involvement of 5-HT 1A and 5-HT2 receptors of the dorsal periaqueductal gray in the regulation of the defensive behaviors generated by the elevated T-maze. **Brain research bulletin**, v. 64 (2), p.181-188, 2004.

STARKE, K. Presynaptic autoreceptors in the third decade: focus on alpha2-adrenoceptors. **J. Neurochem**, v. 78, p.685-693, 2001.

SULLIVAN, G. M.; COPLAN, J. D.; KENT, J. M.; GORMAN, J. M. The noradrenergic system in pathological anxiety: a focus on panic with relevance to generalized anxiety and phobias. **Biol. Psychiatry**, v. 46, p. 1205-1218, 1999.

TEIXEIRA, K. V.; CAROBREZ, A. P. Effects of glycine or (+/-)-3-amino-1-hydroxi-2-pyrrolidone microinjections along the rostrocaudal axis of the dorsal periaqueductal gray matter on rats performance in the elevated plus-maze task. **Behav. Neurosci.**, v. 113, p. 196-203, 1999.

TEIXEIRA, R. C.; ZANGROSSI, H. JR.; GRAEFF, F. G. Behavioural effects of acute and chronic imipramine in the elevated T-maze model of anxiety. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 65, p. 571–576, 2000.

VEENING, J.; BUMA, P.; TER HORST, G. J.; ROELING, T. A. P.; LUITEN, P. G. M.; NIEUWENHUYIS, R. Hypothalamic projections to the PAG in the rat: topographical, immuno-electromicroscopical and functional aspects. In: DEPAULIS, A.; BANDLER, R. **The midbrain periaqueductal gray matter: Functional, anatomical, and neurochemical organization**. New York: Plenum Press, p. 387-415, 1991.

VERSTEEG, D. H. G.; VANDERGUGTEN, J.; JONG, W. D.; PALKOVITS, M. Regional concentrations of noradrenaline and dopamine in rat-brain. **Brain Res.**, v. 113, p. 563-574, 1976.

VIANA, M. B.; TOMAZ, C.; GRAEFF, F. G. The elevated T-maze: a new animal model of anxiety and memory. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 49, p. 549–554, 1994.

VIANA, M. B. Freud e Darwin: ansiedade como sinal, uma resposta adaptativa ao perigo. **Nat. hum.**, São Paulo , v. 12, n. 1, p. 1-33, 2010.

YAMADA, M.; YASUHARA, H. Clinical pharmacology of MAO inhibitors: safety and future. **Neurotoxicology**, v. 25, p. 215–221, 2004.

YERKES, R. M.; DODSON, J. D. The relation of strength of stimulus to rapidity of habit-formation. **J. Comp. Neurol. Psychol.**, v. 18, p. 459-482, 1908.

YOUNG, R.; JOHNSON, D. N. Comparative effects of zacopride, GR 38032F, buspirone and diazepam in the mouse light/dark exploratory model. **Soc. Neurosci. Abstr.**, v. 14, p. 207, 1988.

YOUNG, R.; JOHNSON, D. N. A fully automated light-dark apparatus useful for comparing anxiolytic agents. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 40 (4), p. 739-743, 1991.

ZANOVELI, J. M.; NOGUEIRA, R. L.; ZANGROSSI, H. Jr. Serotonin in the dorsal periaqueductal gray modulates inhibitory avoidance and one-way escape behaviors in the elevated T-maze. **Eur. J. Pharmacol.**, vol. 473 (2-3), p. 153-161, 2003.

ZANOVELI, J. M.; NETTO, C. F.; GUIMARÃES, F. S.; ZANGROSSI, H. Jr. Systemic and intra-dorsal periaqueductal gray injections of cholecystokinin-sulfated octapeptide (CCK-8s) induce a panic-like response in rats submitted to the elevated T-maze. **Peptides**, vol. 25 (11), p. 1935-1941, 2004.



## 8. ANEXO

### 8.1. ANEXO 1 – CÓPIA DA APROVAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA NA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA



# CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. **046/2014**, relativo ao projeto de pesquisa intitulado **"Papel da neurotransmissão noradrenérgica da substância cinzenta periaquedutal dorsal na mediação de comportamentos defensivos relacionados à ansiedade e ao pânico."** que tem como responsável o (a) docente **Valquíria Carmin de Bortoli**, está de acordo com os princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFES), tendo sido aprovado na reunião ordinária de 07/11/14.



Presidente do  
Comitê de Ética no Uso de Animais  
CEUA/UFES

Vitória (ES), 07 de novembro de 2014.